
Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf
die fetale Gehirnreifung am Beispiel von
Glukosetransportproteinen im immunhistochemischen
Studium am fetalen Schaf und Pavian

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem

Rat der medizinischen Fakultät der **Friedrich–Schiller–Universität Jena**

von **Martin Ebert**, geboren am 22.04.1976 in Plauen

Gutachter

1. PD Dr. med. Schwab
2. Prof. Dr. med. Schleussner
3. Prof. Dr. med. Beinder

Tag der öffentlichen Verteidigung: 7. Oktober 2008

*„Es gibt kein größeres Hindernis des Fortgangs in
den Wissenschaften als das Verlangen, den Erfolg
davon zu früh verspüren zu wollen.“*

(Lichtenberg, Georg Christoph)

Abkürzungsverzeichnis:

CO ₂	Kohlendioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAB	Diaminobenzidin
dGa	Day of gestation
DNA	Desoxyribonucleid acid
GLUT1	Glukosetransportprotein 1
GLUT3	Glukosetransportprotein 3
GT	Gestationstag
KG	Körpergewicht
IR	Immunreaktivität
IVTK	Institut für Versuchstierkunde
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
MAP	Mikrotubulin assoziiertes Protein
MCT	Monocarboxylic Acid Transporter
NaBH ₄	Natriumborhydrit
NH ₃	Ammoniak
NIH	National Institutes of Health
NO	Stickoxid
O ₂	Sauerstoff
RDS	Respiratory Distress Syndroms
SSW	Schwangerschaftswoche
11βHSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase

Inhaltsverzeichnis:

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	4
2.1	Glukokortikoide und Geburtshilfe	4
2.2	Glukokortikoideffekte auf die Herz–Kreislaufregulation und den zerebralen Gefäßtonus	6
2.3	Zerebrale Effekte von Glukokortikoiden	8
2.3.1	Glukokortikoideffekte auf die Hirnstruktur	8
2.3.2	Glukokortikoideffekte auf die Hirnfunktion	9
2.4	Wirkmechanismus von Glukokortikoiden	10
2.5	Zerebraler Glukosestoffwechsel, Glukoseutilization und Glukosetransportproteine	11
3	Ziele der Arbeit	15
4	Methodik	17
4.1	Übersicht über die experimentellen Gruppen	17
4.2	Übersicht über das experimentelles Design	19
4.3	Verwendete Glukokortikoide	20
4.4	Experimentelles Protokoll zu Untersuchungen am fetalen Schaf	21
4.4.1	Termingerechte Züchtung der Tiere	21
4.4.2	Untersuchung der Ontogenese von GLUT1 und GLUT3	21
4.4.3	Chirurgische Instrumentierung	22
4.4.4	Untersuchung akuter Glukokortikoideffekte beim Schaffeten	23
4.4.5	Untersuchung chronischer Glukokortikoideffekte beim Schaffeten	24
4.4.6	Gewinnung der fetalen Schafgehirne	25
4.5	Experimentelles Protokoll zu Untersuchungen akuter Betamethasoneffekte auf GLUT1 und GLUT3 am nichtmenschlichen Primaten	25
4.6	Immunhistochemischer Nachweis von Glukosetransportprotein 1 und 3 im fetalen Schaf– und nichtmenschlichen Primatengehirn	27
4.6.1	Vorbereitung der Objektträger	27
4.6.2	Schneiden der fetalen Gehirne	27
4.6.3	Immunhistochemische Färbung	28
4.6.4	Lichtmikroskopische Auswertung und Quantifizierung der Immunfärbung	31
4.7	Statistische Auswertung	33

5	Ergebnisse	34
5.1	Expression von GLUT1 und GLUT3 während der Ontogenese	34
5.1.1	Expression von GLUT1.....	35
5.1.2	Expression von GLUT3.....	37
5.2	Akute Glukokortikoideffekte beim Schaffeten	38
5.2.1	Physiologische Parameter bei maternaler Applikation.....	39
5.2.2	Physiologische Parameter bei fetaler Applikation	41
5.2.3	Betamethasoneffekte auf die Expression von GLUT1	43
5.2.4	Betamethasoneffekte auf die Expression von GLUT3	47
5.3	Akute Glukokortikoidwirkungen beim nichtmenschlichen Primaten...52	
5.3.1	Betamethasoneffekte auf die Expression von GLUT1 und GLUT3..	53
5.4	Chronische Glukokortikoideffekte beim Schaffeten	55
5.4.1	Physiologische Parameter der Mutterschafe zum Gestationszeitpunkt 0.69 und 0.73.....	55
5.4.2	Physiologische Parameter der Schaffeten zum Gestationszeitpunkt 0.69 und 0.73	57
5.4.3	Betamethasoneffekte auf die Expression von GLUT1	59
5.4.4	Betamethasoneffekte auf die Expression von GLUT3	61
6	Diskussion	63
6.1	Methodische Betrachtungen	63
6.1.1	Das fetale Schaf als Model für die intrauterine Entwicklung	63
6.1.2	Glukokortikoidapplikation in Klinik und Experiment.....	64
6.1.3	Immunhistochemische Markierung von Glukosetransportproteinen	65
6.1.4	Quantifizierung der Immunmarkierung.....	68
6.2	Diskussion der Ergebnisse.....	69
6.2.1	GLUT1 und GLUT3 während der Ontogenese im fetalen Schafgehirn 69	
6.2.2	Akute Glukokortikoideffekte auf GLUT1 und GLUT3 am fetalen Schaf- und Primatengehirn.....	75
6.2.3	Chronische Glukokortikoideffekte auf GLUT1 und GLUT3 am fetalen Schafgehirn.....	80
7	Schlussfolgerungen	84
8	Literaturverzeichnis	86
9	Anhang	109
9.1	Danksagung	109
9.2	Lebenslauf.....	110

Inhaltsverzeichnis:

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	4
2.1	Glukokortikoide und Geburtshilfe	4
2.2	Glukokortikoideffekte auf die Herz–Kreislaufregulation und den zerebralen Gefäßtonus	6
2.3	Zerebrale Effekte von Glukokortikoiden	8
2.3.1	Glukokortikoideffekte auf die Hirnstruktur	8
2.3.2	Glukokortikoideffekte auf die Hirnfunktion	9
2.4	Wirkmechanismus von Glukokortikoiden	10
2.5	Zerebraler Glukosestoffwechsel, Glukoseutilization und Glukosetransportproteine	11
3	Ziele der Arbeit	15
4	Methodik	17
4.1	Übersicht über die experimentellen Gruppen	17
4.2	Übersicht über das experimentelle Design	19
4.3	Verwendete Glukokortikoide	20
4.4	Experimentelles Protokoll zu Untersuchungen am fetalen Schaf	21
4.4.1	Termingerechte Züchtung der Tiere	21
4.4.2	Untersuchung der Ontogenese von GLUT1 und GLUT3	21
4.4.3	Chirurgische Instrumentierung	22
4.4.4	Untersuchung akuter Glukokortikoideffekte beim Schaffeten	23
4.4.5	Untersuchung chronischer Glukokortikoideffekte beim Schaffeten	24
4.4.6	Gewinnung der fetalen Schafgehirne	25
4.5	Experimentelles Protokoll zu Untersuchungen akuter Beta-methasoneffekte auf GLUT1 und GLUT3 am nichtmenschlichen Primaten	25

4.6	Immunhistochemischer Nachweis von GLUT1 und GLUT3 im fetalen Schaf- und nichtmenschlichen Primatengehirn	27
4.6.1	Vorbereitung der Objektträger	27
4.6.1.1	Verwendete Chemikalien	27
4.6.1.2	Inkubation der Objektträger	27
4.6.2	Schneiden der fetalen Gehirne	27
4.6.3	Immunhistochemische Färbung	28
4.6.3.1	Verwendete Chemikalien und Arbeitsmittel	28
4.6.3.2	Ablauf der immunhistochemischen Färbung	29
4.6.4	Lichtmikroskopische Auswertung und Quantifizierung der Immunfärbung	31
4.7	Statistische Auswertung	33
5	Ergebnisse	34
5.1	Expression von GLUT1 und GLUT3 während der Ontogenese	34
5.1.1	Expression von GLUT1	35
5.1.2	Expression von GLUT3	37
5.2	Akute Glukokortikoideffekte beim Schaffeten	38
5.2.1	Physiologische Parameter bei maternaler Applikation	39
5.2.2	Physiologische Parameter bei fetaler Applikation	41
5.2.3	Betamethasoneffekte auf die Expression von GLUT1	43
5.2.3.1	Maternale intramuskuläre Injektion	43
5.2.3.2	Intrauterine fetale Infusion	45
5.2.4	Betamethasoneffekte auf die Expression von GLUT3	47
5.2.4.1	Maternale intramuskuläre Injektion	47
5.2.4.2	Intrauterine fetale Infusion	49
5.3	Akute Glukokortikoidwirkungen beim nichtmenschlichen Primaten	52
5.3.1	Betamethasoneffekte auf die Expression von GLUT1 und GLUT3	53
5.3.1.1	GLUT1	53
5.3.1.2	GLUT3	53

5.4	Chronische Glukokortikoideffekte beim Schaffeten	55
5.4.1	Physiologische Parameter der Mutterschafe zum Gestationszeitpunkt 0.69 und 0.73	55
5.4.2	Physiologische Parameter der Schaffeten zum Gestationszeitpunkt 0.69 und 0.73	57
5.4.3	Betamethasoneffekte auf die Expression von GLUT1	59
5.4.4	Betamethasoneffekte auf die Expression von GLUT3	61
6	Diskussion	63
6.1	Methodische Betrachtungen	63
6.1.1	Das fetale Schaf als Modell für die intrauterine Entwicklung	63
6.1.2	Glukokortikoidapplikation in Klinik und Experiment	64
6.1.3	Immunhistochemische Markierung von Glukosetransportproteinen	65
6.1.4	Quantifizierung der Immunmarkierung	68
6.2	Diskussion der Ergebnisse	69
6.2.1	GLUT1 und GLUT3 während der Ontogenese im fetalen Schafgehirn	69
6.2.1.1	GLUT1	69
6.2.1.2	GLUT3	72
6.2.2	Akute Glukokortikoideffekte auf GLUT1 und GLUT3 am fetalen Schaf- und Primatengehirn	75
6.2.3	Chronische Glukokortikoideffekte auf GLUT1 und GLUT3 am fetalen Schafgehirn	80
7	Schlussfolgerungen	84
8	Literaturverzeichnis	86
9	Anhang	109
9.1	Danksagung	109
9.2	Lebenslauf	110

1 Zusammenfassung

Die synthetischen Glukokortikoide Betamethason und Dexamethason werden seit über 30 Jahren zur Förderung der fetalen Lungenreife bei drohender Frühgeburtlichkeit und zur Behandlung eines Respiratory Distress Syndroms (RDS) eingesetzt. Die Therapie wurde am Schaffeten, einem bedeutenden Tiermodell für die menschliche Fetalperiode, entwickelt. In der Klinik und an diesem Modell wurden in den letzten Jahren auch Effekte auf das Zentralnervensystem beim Feten wie eine Suppression der EEG-Aktivität, eine Verzögerung von akustisch evozierten Potentialen oder eine Abnahme der Expression von high turnover Proteinen wie dem Mikrotubulus- assoziierten Protein (MAP) gefunden. Eine mögliche Ursache sind katabole Effekte auf den zerebralen Stoffwechsel, welche unter anderem aufgrund einer Hemmung der Glukoseaufnahme in die Zelle, so gezeigt in der Zellkultur bei adulten Neuronen, verursacht sein können.

Wir haben deshalb die Effekte einer Glukokortikoidapplikation auf die Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT3, über die der Glukosetransport durch Membranen carriergebunden erfolgt, zu definierten Zeitpunkten am chronisch instrumentierten fetalen Schaf in vivo untersucht. GLUT1, das in der Blut-Hirnschranke exprimiert wird und „rate limiting“ ist, und GLUT3, das in der neuronalen Membran vorkommt, stellen dabei sehr wichtige Transportproteine für den zerebralen Glukosetransport dar. Grundlage für die Untersuchung der Glukokortikoideffekte war die Darstellung der Ontogenese von GLUT1 und GLUT3. Hierzu lagen wenige Untersuchungen, hauptsächlich an der postnatalen Ratte und am Kaninchen durchgeführt, vor. Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse vom fetalen Schaf auf den Menschen zu sichern, wurden die Ergebnisse durch Schwerpunktuntersuchungen am frontalen Kortex des nichtmenschlichen Primaten (Gelber Pavian) ergänzt.

Zur Darstellung der Ontogenese der GLUT1 und GLUT3 Expression untersuchten wir den frontalen Kortex des fetalen Schafes zu den Gestationszeitpunkten 0.27, 0.40, 0.53, 0.63, 0.73 und 0.87.

Bezüglich der Glukokortikoiwirkung untersuchten wir in einer zweiten Gruppe Betamethasoneffekte auf die GLUT1 und GLUT3 Expression im frontalen Kortex, dem Striatum und dem Hippokampus des chronisch instrumentierten Schaffeten

zum Gestationszeitpunkt 0.73, entsprechend der 28. SSW beim Menschen, also in einem Alter in dem klinisch Glukokortikoideffekte zur Förderung der fetalen Lungenreife verabreicht werden. Es erfolgte eine zweimalige intramuskuläre Betamethasonapplikation gewichtsadaptiert auf das Mutterschaf mit einer Dosis von $110 \mu\text{g Kg}^{-1}$ im Abstand von 24 Stunden. Dies entsprach einer klinisch angewandten Betamethasondosis von zweimal 8 mg zur Förderung der fetalen Lungenreife für eine 70 Kilogramm schwere schwangere Frau. Zum gleichen Gestationszeitpunkt untersuchten wir Betamethasoneffekte in der gleichen Dosierung am fetalen Paviangehirn.

Mögliche Einflüsse einer unterschiedlichen Plazentapassage zwischen der humanen und ovinen Plazenta, sowie der Abhängigkeit der Effekte von der Pharmakokinetik, sollten in einer dritten Gruppe durch eine direkte fetale Infusion von Betamethason beim chronisch instrumentierten Schaffeten untersucht werden. Dabei erhielten die Schaffeten zum Gestationszeitpunkt 0.73 über 48 Stunden gewichtsadaptiert kontinuierlich $3,3 \mu\text{g Kg}^{-1}$ Betamethason direkt infundiert.

Die Reversibilität der Betamethasoneffekte untersuchten wir in einer vierten Gruppe von chronisch instrumentierten Schaffeten, bei denen das Mutterschaf zwei Behandlungszyklen mit Betamethason (jeweils zweimal $110 \mu\text{g Kg}^{-1}$ Betamethason im Abstand von 24 Stunden) zu den Gestationszeitpunkten 0.69 und 0.73 erhielt.

Nach Beendigung der Infusion oder 24 Stunden nach der zweiten intramuskulären Betamethasonapplikation, 21 Tage später, wurden die fetalen Gehirne nach Perfusionsfixierung aufgearbeitet.

Die Gehirne wurden mittels der ABC-Methode immunhistochemisch gefärbt und die Markierung anschließend durch ein Bildverarbeitungssystem über eine optische Dichtemessung quantifiziert. Wir verwendeten als primären Antikörper Kaninchen Anti-GLUT1 bzw. Kaninchen Anti-GLUT3, als sekundären Antikörper Anti-Kaninchen-IgG.

GLUT1 und GLUT3 ließen sich zu allen Gestationszeitpunkten im sich in Bildung befindlichen frontalen Kortex darstellen, wobei es zu einem Abfall der Expression von GLUT1 und GLUT3 im Verlauf der Gestation kam.

Betamethason zeigte keine signifikanten Effekte auf die Expression von GLUT1 und GLUT3 im Vergleich zur Kontrollgruppe unabhängig vom Gestationsalter und Applikationsweg. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen am fetalen Schaf

ZUSAMMENFASSUNG

konnten wir auch keine Betamethasoneffekte auf die GLUT1 und GLUT3 Expression am nichtmenschlichen Primaten nachweisen.

Damit werden GLUT1 und GLUT3 sehr früh während der Gestation maximal exprimiert, wobei die Expression nicht durch Betamethason gestört wird. Eine Hemmung der Glukoseaufnahme über die Blut–Hirnschranke und in die Neurone ist damit zumindest beim Feten nicht der Mechanismus für katabole Glukokortikoideffekte und die zerebralen Nebenwirkungen einer antenatalen Glukokortikoidtherapie.

2 Einleitung

2.1 Glukokortikoide und Geburtshilfe

Trotz der mannigfaltigen, oftmals kritischen Wirkungen von Glukokortikoiden stellen diese bedeutende Therapeutika dar. Ein wichtiger Einsatzort ist die antenatale Glukokortikoidtherapie zur Förderung der Lungenreife bei drohender Frühgeburtlichkeit. In dieser Indikation sind Glukokortikoide lebensrettend, jedoch wurden in den letzten Jahren auch nichtpulmonale Effekte auf Kreislauf und Zentralnervensystem bei Feten gefunden (siehe Punkt 1), die in Zukunft die Indikationsstellung eventuell eingrenzen werden.

Das Konzept einer Glukokortikoidtherapie beim Feten stammt aus dem Jahre 1969, wo erstmals am fetalen Schaf die Beschleunigung der Lungenreifung durch Betamethason erfolgreich angewandt wurde (Liggins 1969). Im weiteren Verlauf konnte durch Liggins und Howie die präventive Wirkung von synthetischen Glukokortikoiden gegenüber einem Respiratory Distress Syndroms (RDS) in klinischen Studien bestätigt werden, da die perinatale Sterblichkeit deutlich sank (Liggins & Howie 1972), was für die damalige Zeit ein außerordentlicher Erfolg in der Bekämpfung des RDS war.

Vorzeitige Wehen beobachtet man in 7 – 10 Prozent aller Schwangerschaften, wobei die eventuell nachfolgenden Komplikationen für ca. 75 Prozent der perinatalen Mortalität verantwortlich sind (Creasy 1991). Eine häufige Ursache sind genitale Infektionen (Creasy 1991). Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) wird durch pro-inflammatorische Zytokine aktiviert und es kommt zur gesteigerten Prostaglandinsynthese, die Wehen auslösen können (Keelan et al. 1997). Auch chronisch hypoxische Mangelzustände können über die Aktivierung der fetalen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse durch erhöhte Kortisolspiegel zu Wehen führen (Matthews et al. 1995, Durand et al. 1986). Des Weiteren können Mehrlingsschwangerschaften durch eine gesteigerte Dehnung des Uterus oder maternalen Stress über erhöhtes maternales Kortisol vorzeitige Wehen auslösen (Challis et al. 2001).

Heutzutage werden routinemäßig die synthetischen Glukokortikoide Betamethason und Dexamethason in der Geburtshilfe zur Förderung der Lungenreife eingesetzt, da sie das Auftreten des RDS eindämmen (Übersichten in Ballard & Ballard 1995, Crowley 1995). Außerdem wirken sie neuroprotektiv

gegenüber intraventrikulären Blutungen (Elimian et al. 1999, Leviton et al. 1993). Aktuell wird von den National Institutes of Health (NIH) in den USA die Anwendung einer Glukokortikoidbehandlung bei Frauen zwischen der 24. SSW und der 34. SSW empfohlen, wenn bei diesen die Gefahr einer Frühgeburt innerhalb von 7 Tagen droht (NIH Consensus Statement 2000).

In den letzten Jahrzehnten hat die Bedeutung der Lungenreifetherapie stetig zugenommen, da vor allem in den Industrieländern die Frühgeburtenrate, nicht zuletzt durch eine Zunahme der Mehrlingsschwangerschaften, angestiegen ist. Aktuell liegt sie z.B. in den USA bei ca. 12 (Dole et al. 2003, Blondel et al. 2002, MacDorman et al. 2002). In Deutschland liegt die Frühgeburtenrate derzeit bei ca. 9 Prozent (Pildner et al. 2005). Somit ist es auch nicht verwunderlich, dass der Einsatz von Glukokortikoiden zur Lungenreifeinduktion in den USA von 52 Prozent 1995 auf 75 Prozent 2000 angestiegen ist (Meadow et al. 2003). Weiterhin wird durch das heute zunehmende Alter der werdenden Mütter das Risiko einer Frühgeburtlichkeit noch verstärkt, so dass Therapiekonzepte zur Förderung der Lungenreife auch weiterhin von Bedeutung sind (Tough et al. 2002).

Neben den genannten Vorteilen einer antenatalen Glukokortikoidtherapie sind in den letzten Jahren besonders durch tierexperimentelle Studien eine Reihe von unerwünschten Nebenwirkungen, insbesondere metabolische, kardiovaskuläre, zerebrovaskuläre und neuroendokrine Effekte, beschrieben worden, die zum Teil lebenslange Effekte zeigen (Günter et al. 2004).

So konnte durch Untersuchungen an Ratten und Schafen gezeigt werden, dass eine antenatale Glukokortikoidbehandlung, abhängig von der Dosierung, eine Verminderung des Geburtsgewichts zur Folge hat (Sun et al. 1993, Jobe et al. 1993, Pratt et al. 1999). Im Tierversuch konnte weiterhin eine Verzögerung des Wachstums beim unreifen Primaten (Uno et al. 1994) und beim fetalen Schaf (Jobe et al. 1998) schon bei einmaliger maternaler Applikation eines Glukokortikoids gezeigt werden. Ebenso zeigten experimentelle Studien am fetalen Schaf eine Verzögerung des Gehirnwachstums durch antenatal verabreichte Glukokortikoide (Huang et al. 1999, Moss et al. 2005). Auch beim Menschen zeigten sich nach wiederholten Glukokortikoidgaben eine Abnahme des Geburtsgewichts und des Kopfumfanges (Abbasi et al. 2000, Esters et al. 2000, French et al. 1999, Banks et al. 1999).

Im Folgenden sollen die vaskulären Effekte angesprochen werden, da diese die Hirnfunktion direkt und indirekt beeinflussen. Ebenso soll in den folgenden Kapiteln auf zerebrale Nebenwirkungen der Glukokortikoide eingegangen werden.

2.2 Glukokortikoideffekte auf die Herz–Kreislaufregulation und den zerebralen Gefäßtonus

Glukokortikoide erhöhen das Herzminutenvolumen (Padbury et al. 1995, Stein et al. 1993) und führen zu einer Abnahme der Barorezeptorsensitivität (Segar et al. 1998). Die Wirkungen von Glukokortikoiden auf den peripheren und zentralen Gefäßtonus sowie auf die Hirnfunktion sind komplex. Bisher ging man davon aus, dass synthetische Glukokortikoide keine zentralen Effekte auf die sympathische Hirnstammaktivität haben (van den Berg et al. 1990). Jedoch weiß man heute von einer Glukokortikoiddosis abhängigen Aktivierung von Neuronen bei Ratten in der Medulla oblongata, die für die Blutdruckregulation verantwortlich sind (Rong et al. 1999). Die Aktivierung dieser Neuronen führte zu einem abrupten Blutdruckanstieg (Zhu et al. 1995). Über eine Vasokonstriktion erhöhen Glukokortikoide den peripheren Gefäßtonus (Derks et al. 1997) und damit den arteriellen Blutdruck, was in zahlreichen Untersuchungen am unreifen (Tangalakakis et al. 1992) und reifen fetalen Schaf (Derks et al. 1997, Schwab et al. 2000, Roedel 2002) und auch am frühgeborenen Baby (Demarini et al. 1999, Kari et al. 1994) nachweisbar war. Bei adulten Ratten (Levitt et al. 1996, Celsi et al. 1998) und beim adulten Schaf (Dodic et al. 1998) konnte weiterhin gezeigt werden, dass es nach einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung im späteren Leben zu einer persistierenden arteriellen Hypertonie kam. Die blutdrucksteigernde Wirkung von Glukokortikoiden kommt möglicherweise durch eine gesteigerte Empfindlichkeit von fetalen Gefäßen gegenüber vasoaktiven Mediatoren wie Noradrenalin und Thromboxan sowie einer Verminderung der Wirkung von Bradykininen und Prostacyclin bzw. einer gestörten endothelialen Acetylcholinfunktion zustande (Anwar et al. 1999). Blutdrucksteigernd kann auch die Phenylethanolamin–N–Methyltransferase wirken, die durch Glukokortikoide im Nebennierenmark (Wurtman & Axelrod 1966, Wong et al. 1985, Wan & Livett 1989) aber auch in anderen extraadrenalen Geweben (Ciaranello et al. 1973, Moore & Phillipson 1975, Bohn et al. 1982,

Kennedy et al. 1993) exprimiert wird und ihre Wirkung über eine Steigerung der Adrenalin synthese entfaltet. Dies konnte sowohl bei der fetalen, als auch bei der adulten Ratte nachgewiesen werden.

Durch unsere Arbeitsgruppe konnten direkte Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf das zerebrovaskuläre System des Schaffeten in utero nachgewiesen werden. Dabei kam es beim fetalen Schaf 24 Stunden nach Betamethasonapplikation zu einem signifikanten Abfall der fetalen Hirndurchblutung (Schwab et al. 2000, Roedel 2002). Ähnlich wie beim peripheren Gefäßsystem kommt es zum Anstieg des zerebrovaskulären Widerstandes durch Betamethasongabe (Schwab et al. 2000, Roedel 2002). Die Glukokortikoideffekte waren unabhängig vom Gestationsalter im letzten Drittel der Schwangerschaft nachweisbar (Löhle et al. 2005). Diese Veränderungen fanden vor bzw. während des vorgeburtlichen Kortisolanstieges statt und führten zu einer Störung der zerebralen Autoregulation (Müller et al. 2002). Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine Hemmung der Prostaglandin- und NO-Synthese (Wood et al. 2003, Löhle et al. 2005). Diese Wirkung ist in vielen Geweben, so auch im Gefäßendothel (Blajchman et al. 1979, Crutchley et al. 1985, De Caterina & Weksler 1986) und Hirngewebe (Weidenfeld et al. 1987), nachweisbar. Den Prostaglandinen wird im fetalen Gehirn eine besondere Bedeutung zuteil, denn diese sind hier der wichtigste hormonelle Stimulus bei der Regulation des zerebralen Gefäßtonus (Benders et al. 1995, Jones et al. 1993, Leffler & Busija 1987). Somit kann die Vermutung geäußert werden, dass in hohem Maße vor allem das vasodilatorisch wirkende Prostaglandin durch Steroide gehemmt wird. Die unterdrückende Wirkung der Glukokortikoide auf die Prostaglandinsynthese erfolgt über die Expression eines Hemmproteins (Lipocortin) der Phospholipase A2. Dadurch wird die Freisetzung der Arachidonsäure, die Ausgangssubstanz für Prostaglandine und Leukotriene ist, blockiert (Übersicht in Karow/Lang 2003). Der inhibierende Effekt der Prostaglandinsynthese durch Glukokortikoide wurde hauptsächlich für das vasodilatorisch wirkende Prostaglandin E2 nachgewiesen (Leffler & Busija 1987, Sessa & Nasjletti 1990, Wagerle et al. 1991).

2.3 Zerebrale Effekte von Glukokortikoiden

2.3.1 Glukokortikoideffekte auf die Hirnstruktur

Die physiologischen Glukokortikoide Kortisol und Kortison sind körpereigene Stresshormone. Obwohl sie für die normale Hirnreifung essentiell sind, können bei hohen Plasmaspiegeln, z.B. bei Stress oder nach Pharmakotherapie, neurotoxische Effekte auftreten (Übersicht McEwen et al. 1995, Sapolsky 1994, Scully & Otten 1995) und es kommt zu Apoptose auslösenden Vorgängen (Hassan et al. 1996). Diese Vorgänge traten sowohl in vitro, als auch in vivo auf. Dabei kam es durch Apoptose zu Dendritendegeneration, nachweisbar im Hippokampus der fetalen und adulten Ratte, sowie im Primatengehirn (Sapolsky et al. 1990, Scully & Otten 1995, Uno et al. 1994, Uno et al. 1990). Schon frühzeitig konnte in Studien gezeigt werden, dass die Neuro- und Gliagenese und nachfolgend auch die Myelinisierung durch Glukokortikoide negativ beeinflusst wird (De Kloet et al. 1988, Gumbinas et al. 1973, Howar & Benjamins 1975). So konnte sowohl bei der Ratte, als auch beim Schaf abhängig von der Glukokortikoiddosierung eine Abnahme myelinisierter Axone anhand des Nervus opticus und des Corpus callosum gezeigt werden (Gumbinas et al. 1973, Bohn & Friedrich 1982, Dunlop et al. 1997, Quinlivan et al. 2000 u. 2001). Diese Effekte sind wahrscheinlich reversibel und verzögern nur die Myelinisierung (Gumbinas et al. 1973, Bohn & Friedrich 1982). Bei den gerade aufgezeigten Effekten scheinen Typ II Rezeptoren (siehe Punkt 2.4), für die Beta- und Dexamethason hoch spezifisch sind, eine bedeutende Rolle zu spielen, da für diese Rezeptoren gezeigt werden konnte, dass sie neurotoxische Effekte und Apoptose vermitteln können (Hassan et al. 1996).

Nach einer antenatalen Behandlung mit Glukokortikoiden fiel weiterhin ein akuter Verlust von Mikrotubulus-assoziiertem Protein (MAP) beim unreifen Primaten (Antonow-Schlorke et al. 2003) und beim fetalen Schaf (Schwab et al. 2001) auf. MAP's gehören zu den Zytoskelettproteinen, die in den Zellen aller Vertebraten vorkommen (Arnold & Trojanowski 1996, Viereck et al. 1988). Bedeutung haben diese in der Morpho- und Synaptogenese im sich entwickelnden Nervensystem (Johnson & Jope 1992, Matus 1991, Tucker 1990), weiterhin bei der Stabilisierung von Nervenzellfortsätzen und beim intrazellulären Nährstofftransport (Bershadsky

& Vasiliev 1989). Die zu verzeichnenden histologischen Veränderungen werden nicht durch die Reifung der Hypothalamus–Hypophysen–Nebennierenrinden–Achse in den letzten Schwangerschaftswochen und den damit einhergehenden physiologischen Kortisolanstieg beeinflusst (Antonow-Schlorke et al. 2002). Durch eine Glukokortikoidbehandlung konnte des Weiteren eine akute Verminderung von Synaptophysin festgestellt werden (Antonow-Schlorke et al. 2001, Colberg et al. 2004). Synaptophysin ist ein Protein der synaptischen Vesikel und gestattet Aussagen bezüglich der synaptischen Dichte. Die Effekte einer Glukokortikoidbehandlung auf MAP und Synaptophysin waren jedoch innerhalb von 24 Stunden reversibel (Antonow-Schlorke et al. 2006, Colberg et al. 2004).

2.3.2 Glukokortikoideffekte auf die Hirnfunktion

Entsprechende Wirkungen von Glukokortikoiden am adulten Tier und am Mensch waren auch Bestandteil von vielen Untersuchungen in Bezug auf Emotion, Vigilanz, Kognition und Gedächtnis sowie Wachstum. So haben Glukokortikoide möglicherweise auch Einfluss auf das limbische System (Übersicht Lupien & McEwen 1997). Brabham et al. (2000) und Emgard et al. (2007) berichten beispielsweise über Defizite der kognitiven Funktion (z.B. räumliches Lernen) und über eine gestörte Stressantwort bei adulten Ratten, deren Mütter pränatal mehrfach Glukokortikoiden erhalten hatten. Weiterhin wurde im Zusammenhang mit einer multiplen Glukokortikoidgabe während der Schwangerschaft auch über eine verzögerte mentale und psychomotorische Entwicklung in der Kindheit und Jugendzeit diskutiert (Esplin et al. 2000, Sinervo et al. 1999). Trautman et al. (1995) beschrieben eine Zunahme von gestörter Emotionalität, Vermeidungsverhalten, Ungeselligkeit und allgemeinen Problemen im Umweltverhalten bei Kindern, deren Mütter pränatal wiederholt Glukokortikoide erhalten hatten.

Ferner gibt es nur wenige Untersuchungen am fetalen Gehirn. Beim fetalen Schaf wurde unter Betamethason eine gestörte elektrokortikale Funktion nachgewiesen (Schwab et al. 2001). Unter Betamethason kommt es auch akut zu einer Verzögerung von kortikalen akustisch evozierten Potentialen beim humanen Feten als Ausdruck einer gestörten Hirnfunktion (Schleussner et al. 2004). Interessant ist

weiterhin, dass es beim menschlichen Feten nach maternalen Applikation von Betamethason bzw. Dexamethason zu einer Abnahme von Körperaktivität und Atemaktivität sowie Herzfrequenzvariabilität als Ausdruck einer veränderten Hirnstammfunktion kam (Mulder et al. 1994, Derks et al. 1995, Senat et al. 1998). Bei frühgeborenen Babys wurde in diesem Zusammenhang ein verzögertes Einsetzen von kognitiven und psychomotorischen Fähigkeiten beobachtet (Esplin et al. 2000). Somit kam es also durch Glukokortikoide zu nachweisbaren Verhaltensänderungen, wobei selbst eine stressbedingte maternale Ausschüttung von Kortisol abhängig vom augenblicklichen Gestationsalter beim Feten zu nachweisbaren Verhaltenseffekten und neuroendokrinen Veränderungen führt (Weinstock 1997). Änderungen im Verhalten und Lernen durch eine pränatale Glukokortikoidbehandlung konnten weiterhin an der Maus und an der Ratte beobachtet werden (Benesova & Pavlik 1989, DeKosky et al. 1982, Howard 1973, Vicedomini et al. 1986). Allerdings konnte Dalziel et al. 2005 an Erwachsenen, deren Mütter eine einmalige pränatale Betamethasondosis zur Förderung der Lungenreife erhalten hatten, 30 Jahre später keine Effekte auf Kognition, Gedächtnis und Neurologie nachweisen.

2.4 Wirkmechanismus von Glukokortikoiden

Glukokortikoide sind lipophile Substanzen, die die Blut–Hirnschranke gut durchdringen und unter Stress bis auf das 10–fache ansteigen können (Übersicht Karow/Lang-Roth 2003). Ihre Wirkung entfalten Glukokortikoide durch Änderung der Transkription spezifischer Gene über Kortikoidrezeptoren Typ I und Typ II und Bindung an einen cytoplasmatisch oder nucleär lokalisierten Rezeptor, der zu den Steroidrezeptoren gehört (Übersichten Löffler und Petrides 1997).

Beide Kortikoidrezeptoren (Typ I und Typ II) kommen im Gehirn vor. Am Typ I–Rezeptor binden eher Mineralokortikoide bzw. das physiologisch vorkommende Kortisol, am Typ II–Rezeptor vor allem die synthetischen Glukokortikoide Betamethason und Dexamethason (Yang et al. 1990, Übersichten Klinke, Silbernagel 1996). Die Genexpression kann am Glukokortikoidrezeptor sowohl durch direkte Bindung an DNA, als auch DNA–bindungsunabhängig über Protein–Protein–Wechselwirkungen beeinflusst werden (Beato et al. 1995, Mangelsdorf et

al. 1995). Voraussetzung für die Bindung an DNA, ein sogenanntes „glucocorticoid response element“, ist die Bildung eines Rezeptor Dimers. Die Repression von Genen erfordert keine DNA-Bindung.

Typ I-Rezeptoren findet man im Hippocampus und Hypothalamus (Ahima et al. 1991). Sie vermitteln im adulten Rattengehirn neuroprotektive Effekte (Hassan et al. 1996). Typ II-Rezeptoren dagegen kommen in den meisten Gehirnregionen, einschließlich dem zerebralen Kortex vor (Ahima & Harlan 1990, Cintra et al. 1994) und lassen sich ab dem Gestationszeitpunkt 0.55 in der weißen Substanz des Schaffeten nachweisen (Brodhuhn 2003). Sie führen zu einer Abnahme der neuronalen Erregbarkeit (Übersicht in Joels & de Kloet 1992, Joels & de Kloet 1994). Weiterhin werden über Typ II-Rezeptoren katabole Glukokortikoidwirkungen, neurotoxische und Apoptose induzierende Effekte vermittelt (Hassan et al. 1996, Joels & de Kloet 1992, 1994, Packan & Sapolsky 1990).

2.5 Zerebraler Glukosestoffwechsel, Glukoseutilization und Glukosetransportproteine

Ganz allgemein kann man die Wirkung von Glukokortikoiden auf den Glukosestoffwechsel als katabol bzw. insulinantagonistisch bezeichnen, da diese den Blutglukosespiegel über eine gesteigerte Glukoneogenese und Glykogensynthese steigern (Übersicht in Karow/Lang-Roth 2003). Unter Glukokortikoiden kommt es außerdem zu einer verminderten lokalen Glukoseutilization, was im adulten (Doyle et al. 1994) und sich in Entwicklung befindlichen Gehirn (Tuor et al. 1997) beobachtet werden konnte. So bewirken Glukokortikoide während der Hirnentwicklung eine Verminderung der zerebralen Glukoseutilization (Tour et al. 1997). Im Einklang dazu führte Betamethason beim fetalen Schaf bereits in der klinisch verabreichten Dosis zu einer Senkung der Enzymaktivitäten von Atmungskettenenzymen beim fetalen Schaf (Schwab et al. 2006a). Entscheidend für die Hirnentwicklung bzw. die Hirnfunktion ist jedoch der zerebrale Glukosestoffwechsel, da Glukose der wichtigste Energielieferant der benötigten Stoffwechselenergie darstellt (Scheinberg 1965, Susan et al. 2003). So beträgt z.B. der Energiebedarf des adulten menschlichen Gehirns 15 Prozent des

Gesamtbedarfs des menschlichen Organismus (Übersichten in Klinker R, Silbernagel S. 1996). Im REM-Schlaf besitzt das Gehirn eine hohe Stoffwechselaktivität, der Fetus verbringt im letzten Viertel der Schwangerschaft fast 50 Prozent der Zeit im REM-Schlaf (Schwab et al. 2006b), so dass eine kontinuierliche Glukosezufuhr sichergestellt werden muss (Übersicht in Löffler und Petrides 1997). Eine weitere Möglichkeit der Energiegewinnung und Verwertung besteht in dem Verbrauch von Ketonkörpern, was z.B. beim jungen Säugling zu beobachten ist (Hawkins et al. 1986). Glukose wird über spezielle Transportsysteme durch die Plasmamembran transportiert. Dies wird prinzipiell über zwei Mechanismen gewährleistet: Einmal durch einen sekundär aktiven, natriumabhängigen Glukosetransport, der hauptsächlich an der luminalen Seite des Epithels des Intestinaltraktes und der Niere lokalisiert ist und zum anderen durch erleichterte Diffusion über Glukosetransportproteine, die praktisch Carrierproteine darstellen (Takata 1996, Übersicht in Löffler und Petrides 1997). Diese Transportwege sind nötig, da freie Glukose die Lipiddoppelschicht der Membranen nicht passieren kann. Insofern wird so für den Glukosetransport quasi ein „Hydrophiler Kanal“ geschaffen. Glukosetransportproteine, von denen derzeit ca. 12 Isoformen bekannt sind (Hanu et al. 2000, Sakyo et al. 2002), weisen untereinander beträchtliche Ähnlichkeit auf, wobei die unterschiedlichen Isoformen gewebs- bzw. zellspezifisch exprimiert werden. Für unsere Untersuchungen waren zwei Glukosetransportproteine von besonderer Bedeutung, nämlich GLUT1 und GLUT3. Diese beiden Isoformen sind hauptsächlich an der zerebralen Glukoseaufnahme beteiligt (Dwyer et al. 2002, Vannucci et al. 1997, Nehlig 1997). Weiterhin haben Glukosetransportprotein 1 und 3 Bedeutung an der Vermittlung des Transportes von Dehydroascorbinsäure, da diese eine ähnliche Struktur wie Glukose aufweist (Rumsey et al. 1997). Im Gehirn kommt GLUT1 in zwei molekularen Massen vor, einmal als 55 kDa großes Molekül, was in hoher Konzentration in Kapillaren des Endothels, vor allem in der Blut-Hirnschranke, vorhanden ist, und als 45 kDa großes Molekül, angesiedelt im Plexus choroideus, in Gliazellen und im Hirnparenchym (Dick et al. 1984, Gerhart et al. 1989, Maher et al. 1993, Vannucci et al. 2003). Interessant ist weiterhin, dass GLUT1 limitierend für die Glukoseaufnahme in das Gehirn ist (Vannucci et al. 1994, Übersichten Löffler und Petrides 1997). GLUT3 stellt das dominierende Glukosetransportprotein in der neuronalen Membran dar (Maher et al. 1991,

Bondy et al. 1992, Vannucci et al. 2003) und kommt auch in den Purkinjezellen des Kleinhirns vor (Fields et al. 1999). Dagegen konnte GLUT3 nicht in der Blut-Hirnschranke nachgewiesen werden (Bondy et al. 1992, Maher et al. 1993). Die Glukoseaufnahme in das Neuron durch GLUT3 wird dabei auch bei geringen lokalen Glukosekonzentrationen durch einen niedrigen K_M Wert für Glukose begünstigt (Maher et al. 1996, Caruthers 1990). Beide Transportsysteme, GLUT1 und GLUT3, arbeiten insulin-unabhängig (Maher et al. 1996, Khan et al. 1999).

Eine wichtige Funktion von GLUT1 ist die Vermittlung des erleichterten Glukosetransportes durch die Blut-Hirnschranke, da diese für Glukose eine natürliche Barriere darstellt. Dabei befindet sich der Glukosetransporter sowohl an der luminalen, als auch an der abluminalen Membran (Greger et al. 1996). Die Blut-Hirnschranke dient der Konstanthaltung des intrazerebralen, zentralen Milieus und stellt damit eine Epithelbarriere zum peripheren Organismus dar. Schon 1885 stellte Paul Ehrlich fest, dass die Applikation eines Farbstoffes in das periphere Blut das Gehirn ausspart und somit eine Barrierefunktion vorhanden sein muss (Roche-Lexikon Medizin 1998). Die eigentliche Blut-Hirnschranke zwischen Kapillarendothel und zentralnervösem Extrazellarraum wird von Endothelzellen, die durch enge tight junctions verbunden sind, umgebenden Perizyten und gemeinsamer Basalmembran gebildet (Übersicht Benninghof 1994). Durchgängig ist die Blut-Hirnschranke für lipophile Substanzen und weiterhin für O_2 , CO_2 und NH_3 (Übersicht in Löffler und Petrides 1997). Neben den wichtigen Carriersystemen für Glukose, Aminosäuren und unter bestimmten Bedingungen auch Ketonkörpern (Löffler und Petrides 1997, Gerhardt et al. 1997, Leino et al. 1999) sind auch Astrozyten an Transport und Freisetzung wichtiger Strukturelemente sowie Enzymen beteiligt (Abbott 2002). Glukose wird an der Blut-Hirnschranke aber wahrscheinlich selektiv durch GLUT1 transportiert (Vannucci et al. 1994).

Die Expression von GLUT1 und GLUT3 im fetalen Gehirn scheint entwicklungsabhängig zu sein. So wurden GLUT1 und GLUT3 schon im fetalen Rattengehirn nachgewiesen, die Spiegel von GLUT1 und GLUT3 steigen speziell postnatal mit Fortschreiten der Reifung weiter stark an (Vannucci, 1994, Nagamatsu et al. 1994). Es wird angenommen, dass das fetale Gehirn seine Energie quasi aus einem „Nährstoffmix“ schöpft, der aus Glukose, Laktat und

Ketonkörpern besteht (Cremer 1982, Nehlig 1997). Anaerobe Stoffwechselwege spielen im fetalen Gehirn eine bedeutende Rolle (Matsumoto et al. 1995).

Die neuronale Glukoseverwertung im sich entwickelnden Gehirn ist in den einzelnen Hirnregionen lokal unterschiedlich ausgeprägt (Hawkins et al. 1986, Nehlig et al. 1993). So konnte beispielsweise bei neugeborenen Ratten sowie bei neugeborenen Affen und menschlichen Neugeborenen gezeigt werden, dass ein früher Anstieg von GLUT3 vor allem im Thalamus zu verzeichnen war (Chugani und Phelps 1986, Chugani et al. 1987, Kennedy et al. 1982, Nehlig et al. 1988, Vannucci et al. 1989). Die Expression von GLUT1 und GLUT3 hängt dabei stark von der regional unterschiedlichen Glukoseverwertung ab, GLUT1 ist dabei mengenlimitierend für die Glukoseaufnahme in das Gehirn (Sokoloff et al. 1977, Nehlig et al. 1988, Vannucci et al. 1998).

Postnatal stellt sich die Situation so dar, dass unter physiologischen Bedingungen zunehmend Glukose als Energiespender „Nummer Eins“ an Bedeutung gewinnt und die anaeroben Stoffwechselwege in den Hintergrund treten (Cremer 1982, Nehlig 1997). Gerade in der postnatalen Phase kommt es zu einem Anstieg des messbaren Hirnstoffwechsels und der Gehirnaktivität, was durch die größere Anzahl der synaptischen Verbindungen (Aghajanian et al. 1967), einem Anstieg der bioelektrischen Aktivität (Deza et al. 1967, Cocks et al. 1970) und letztendlich auch in einer Zunahme der Glukoseutilization am Beispiel der Ratte gezeigt werden konnte (Vannucci et al. 1994).

Horner et al. (1990) konnte bei experimentellen Untersuchungen bei in vitro gezüchteten Neuronen einen Abfall der Glukoseaufnahme in die Zelle unter Dexamethasongabe nachweisen. Die Konzentration an GLUT wurde dabei nicht gemessen. Interessant wäre es, ob im fetalen Gehirn eine verminderte Glukoseaufnahme in die Zelle auch unter in vivo Bedingungen nachzuweisen ist.

3 Ziele der Arbeit

Unter dem Aspekt der häufigen Glukokortikoidgabe an schwangere Frauen zur Förderung der fetalen Lungenreifung gewinnen Faktoren, die die frühkindliche und spätere Entwicklung sowie eine spätere Krankheitsdisposition beeinflussen können, zunehmend an Bedeutung.

Wie in der Einleitung ausgeführt gibt es eine Vielzahl von akuten Glukokortikoideffekten auf die Hirnstruktur und Hirnfunktion. Eine Ursache hierfür sind möglicherweise katabole Glukokortikoideffekte auf den zerebralen Stoffwechsel (siehe Punkt 2.3). Wesentlich scheinen hier neben der Hemmung der Enzyme der Atmungskette (Schwab et al. 2006b) auch Glukokortikoideffekte auf die Glukoseaufnahme zu sein, denn in der Zellkultur konnte bei adulten Neuronen gezeigt werden, dass die Glukoseaufnahme gehemmt wird (Horner et al. 1990). GLUT1, das in der Blut-Hirnschranke exprimiert wird und GLUT3, das in der neuronalen Membran vorkommt, stellen dabei sehr wichtige Transportproteine für den zerebralen Glukosetransport dar, GLUT1 ist dabei limitierend für die Glukoseaufnahme ins Gehirn. Die Glukosetransporter wurden in diesen in vitro Untersuchungen aber nicht untersucht. Außerdem wurden keine Glukokortikoideffekte auf die Glukoseaufnahme am sich entwickelnden Gehirn untersucht.

Unsere Arbeitshypothese war, dass Glukokortikoide, in der klinisch angewandten Dosis zur Förderung der Lungenreife, GLUT1 und GLUT3 hemmen.

Wir haben deshalb immunhistochemisch die Effekte einer Glukokortikoidapplikation, wie sie in der Geburtshilfe zur Förderung der Lungenreife Frühgeborener praktiziert wird, auf die Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT3, über die der Glukosetransport carriergebunden erfolgt, in vivo am chronisch instrumentierten Schaf geprüft.

Das fetale Schaf ist ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung der Fragestellungen, da hier die Glukokortikoidtherapie zur Förderung der Lungenreife bei drohender Frühgeburt (siehe Punkt 2.1) entwickelt wurde (Liggins & Howie 1969). Dieses Tiermodell wurde weiterhin für eine Vielzahl anderer physiologischer und pathophysiologischer Fragestellungen erfolgreich eingesetzt. Untersuchungen am fetalen Schaf haben sich stets als eine solide Basis für nachfolgende Studien mit Primaten zu Kernfragestellungen erwiesen. Weiterhin

ähnelt der zeitliche Ablauf der intrauterinen Entwicklung der des menschlichen Feten, auch wenn das Schafgehirn zur Geburt reifer als das menschliche Gehirn ist (Astrom 1967, Dobbing & Sands 1979). Beim Schaf sind im Allgemeinen Einlings- oder Zwillingssträchtigkeiten zu erwarten. Die Größe und Robustheit der Feten erlauben im Gegensatz zu Ratten oder anderen Kleinnagern einerseits und Primatenfeten andererseits eine umfangreiche Instrumentierung. Daneben werden invasive Untersuchungen auch von den Muttertieren gut toleriert. In unserer Arbeitsgruppe konnten wir bei vorausgegangenen Untersuchungen zeigen, dass schon zwei Tage postoperativ keine Einflüsse der Instrumentierung auf die fetale kortikale Hirnaktivität nachweisbar waren.

Wir verabreichten dem Mutterschaf gewichtsadaptiert das synthetische Glukokortikoid Betamethason zum Zeitpunkt 0.73 der Gestation intramuskulär, also in einem Zeitraum, in dem auch in der Klinik Glukokortikoide verabreicht werden. Mögliche Einflüsse einer unterschiedlichen Plazentapassage zwischen humaner und oviner Plazenta sowie die Abhängigkeit der Glukokortikoideffekte von der Pharmakokinetik untersuchten wir durch eine direkte fetale Infusion von Betamethason zum Zeitpunkt 0.73 in einer weiteren Gruppe von Schaffeten.

Die Reversibilität der Effekte von Betamethason untersuchten wir 20 Tage nach einer in der Klinik häufig durchgeführten wiederholten Glukokortikoidgabe. Hierzu applizierten wir Betamethason als gewichtsadaptierte Dosis intramuskulär in zwei Behandlungszyklen im Abstand von einer Woche an zwei verschiedenen Gestationszeitpunkten (0.69 und 0.73).

Grundlage für die Untersuchung der Glukokortikoideffekte war die Darstellung der Ontogenese von GLUT1 und GLUT3. Obwohl postnatal eine Zunahme der GLUT1 und GLUT3 Expression während der Ontogenese bei der Ratte nachgewiesen wurde (Vannucci, 1994, Nagamatsu et al. 1994, Cremer 1982, Nehlig 1997), gibt es am gyrierten Gehirn und intrauterin dazu bisher kaum Daten.

Die Untersuchungen zu den Glukokortikoideffekten auf GLUT1 und GLUT3 am fetalen Schaf wurden, um die Übertragbarkeit auf den Menschen herzustellen, durch Schwerpunktuntersuchungen am frontalen Kortex des nichtmenschlichen fetalen Primaten ergänzt.

4 Methodik**4.1 Übersicht über die experimentellen Gruppen**

In der vorliegenden Tabelle (Tab. 1) sind die einzelnen experimentellen Gruppen dargestellt. Die Trächtigkeit des Schafes beträgt ca. 150 Tage, die des Gelben Pavians ca. 180 Tage.

Tab. 1:

Zusammenfassung der einzelnen experimentellen Schaf- und Paviangruppen.

Untersuchungsziel	Tiergruppe
Fetale Schafe 1.) Ontogenese von GLUT1 und GLUT3	<u>40. GT (Gestationstag)</u> entspricht dem Zeitpunkt 0.27 der Gesamtgestation (n = 6) <u>60. GT</u> entspricht dem Zeitpunkt 0.40 der Gesamtgestation (n = 7) <u>80. GT</u> entspricht dem Zeitpunkt 0.53 der Gesamtgestation (n = 7) <u>95. GT</u> entspricht dem Zeitpunkt 0.63 der Gesamtgestation (n = 7) <u>110. GT</u> entspricht dem Zeitpunkt 0.73 der Gesamtgestation (n = 9) <u>130. GT</u> entspricht dem Zeitpunkt 0.87 der Gesamtgestation (n = 5)

2.) Akute Glukokortikoideffekte auf GLUT1 und GLUT3	Maternale intramuskuläre sowie fetale intravenöse Applikation einer gewichtsadaptierten klinischen Glukokortikoiddosis am 110. GT (entspricht dem Zeitpunkt 0.73 der Gesamtgestation). Kontrolle (maternale intramuskuläre Applikation) (n = 3) Behandelt (maternale intramuskuläre Applikation) (n = 3) Kontrolle (fetale intravenöse Applikation) (n = 9) Behandelt (fetale intravenöse Applikation) (n = 8)
3.) Chronische Glukokortikoideffekte auf GLUT1 und GLUT3	Maternale intramuskuläre Applikation einer gewichtsadaptierten Glukokortikoiddosis am 104. GT. (entspricht dem Zeitpunkt 0.69 der Gesamtgestation) und am 110. GT (entspricht dem Zeitpunkt 0.73 der Gesamtgestation). Kontrolle (maternale, intramuskuläre Applikation) (n = 5) Behandelt (maternale, intramuskuläre Applikation) (n = 8)
<u>Nichtmenschliche</u> <u>Primaten</u> 4.) Akute Glukokortikoideffekte auf GLUT1 und GLUT3	Maternale intramuskuläre Applikation einer gewichtsadaptierten klinischen Glukokortikoiddosis am 130. GT (entspricht dem Zeitpunkt 0.73 der Gesamtgestation). Kontrolle (maternale intramuskuläre Applikation) (n = 8) Behandelt (maternale intramuskuläre Applikation) (n = 7)

4.2 Übersicht über das experimentelles Design

In den vorliegenden Untersuchungen sollte Betamethason in den verschiedenen Schafgruppen, im Gegensatz zur menschlichen Situation, gewichtsadaptiert auf die Mutter maternal intramuskulär verabreicht werden, um konstante experimentelle Bedingungen zu erreichen. Eine chronische Instrumentierung der Feten wurde durchgeführt, um die Effekte nach maternaler Betamethasonapplikation mit denen nach direkt fetaler intravenöser Gabe vergleichen zu können. Des Weiteren konnte durch die Instrumentierung ein Monitoring der fetalen Gesundheit (Blutdruck, EKG, Blutgaskontrollen) durchgeführt werden. Bei den Untersuchungen zur Ontogenese waren die Mutterschafe und Feten nicht instrumentiert. Auch die fetalen Paviane waren nicht instrumentiert.

Die Experimente am fetalen Schaf und am nichtmenschlichen Primaten fanden mit Unterstützung des Instituts für Versuchstierkunde der Friedrich–Schiller–Universität Jena und des Department of Biomedical Sciences, Laboratory for Pregnancy and Newborn Research, College of Veterinary Medicine, Cornell University Ithaca, New York statt und waren durch die Tierschutzkommission des Landes Thüringen und des Cornell University Animal Use and Care Committee genehmigt worden. Es wurden Schafe der amerikanischen Rassen Rambouillet–Colombia bzw. ihrer deutschen Entsprechung Merino-Schwarzkopf sowie nichtmenschliche Primaten der Rasse „Gelber Pavian“ eingesetzt. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen in einem entsprechenden Tierstall unter Aufsicht eines Tierarztes, wobei dem zu experimentellen Untersuchungen genutzten Schaf jeweils ein weiteres Schaf zur Seite stand, da Schafe Herdentiere und daher Gesellschaft gewohnt sind. Die Paviane wurden einzeln in Sichtweite von anderen Tieren gehalten.

Auf eine Akklimatisierung in den Tierställen und Käfigen von mindestens fünf Tagen vor Instrumentierung und fünf Tagen nach OP–Instrumentierung wurde geachtet. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und waren einem festen Tag–Nacht–Rhythmus bzw. Hell–Dunkel–Rhythmus von 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkelheit ausgesetzt. Die Raumtemperatur betrug 20° C.

An den Untersuchungen am chronisch instrumentierten Schaf (Unterbringung und Vorbereitung der Schafe, Instrumentierung und anschließende medikamentöse

Behandlung, Perfusion der fetalen Gehirne und Tieffrieren) waren aufgrund der Komplexität der Experimente mehrere Mitarbeiter beteiligt. Meine Aufgabe bestand in der Gewinnung, Aufarbeitung, immunhistochemischen Färbung und Untersuchung der fetalen Gehirne.

4.3 Verwendete Glukokortikoide

Als Glukokortikoid wurde von uns Betamethasonphosphat (Celestan soluble Essex, München, Deutschland), ein auch in der Klinik standardgemäß eingesetztes Glukokortikoid zur Förderung der fetalen Lungenreife bei drohender Frühgeburtlichkeit (NIH 2000), verwendet. Die klinische Gabe von Glukokortikoiden in der Geburtshilfe wird von dem NIH (National Institute of Health) in dieser Indikation empfohlen (NIH 2000). Betamethason und auch Dexamethason sind synthetische Glukokortikoide, die sich in ihrer Struktur ähneln. Sie haben annähernd gleiche biologische Aktivität sowie beim geplanten experimentellen Tiermodell eine identische Wirksamkeit (Derks et al. 1997). Beide Medikamente werden auch in Deutschland routinemäßig in der Geburtshilfe eingesetzt. Im Unterschied zu Kortisol weisen synthetische Glukokortikoide einen stärkeren Glukokortikoideffekt auf. Erklärbar wird das durch ungleiche Affinität zu Transcortin, was ein Kortisol transportierendes Globulin darstellt und unter physiologischen Bedingungen 90 Prozent des Plasmakortisols binden kann, bzw. zum Typ I- und Typ II-Rezeptor und zum cytosolischen Kortisolrezeptor oder aber durch längere Wirksamkeit (Übersichten in Löffler und Petrides 1997).

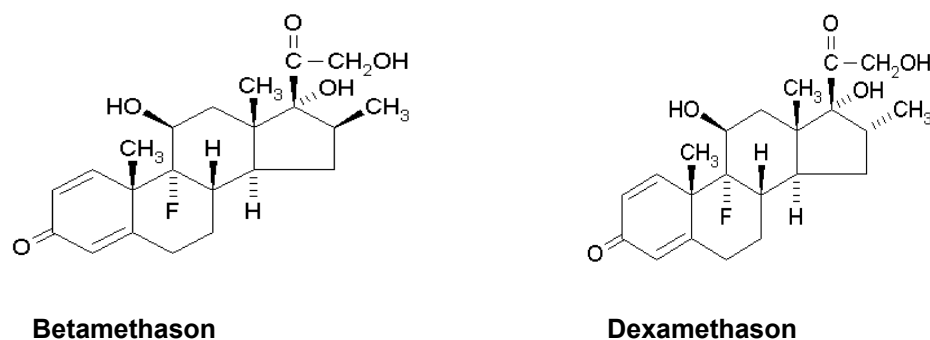


Abb. 1:
Struktur von Betamethason und Dexamethason

4.4 Experimentelles Protokoll zu Untersuchungen am fetalen Schaf

4.4.1 Termingerechte Züchtung der Tiere

Um eine terminierte Verpaarung beim Schaf zu erreichen sowie eine exakte experimentelle Planung zu ermöglichen und jahreszeitlich weitestgehend unabhängig zu sein, wurde ein standardisiertes Verfahren zur Ovulationsauslösung angewandt (Müller et al. 2003). Damit war es möglich, bei dem Mutterschaf, unabhängig von der Jahres- bzw. Paarungszeit, eine Ovulation zu erreichen. Dabei wurde dem Mutterschaf, um vorerst eine Zyklusblockade herbeizuführen, ein mit Gestagenen getränkter vaginaler Schwamm implantiert, wobei die Gestagene kontinuierlich freigesetzt wurden. Mit dem Ziel, ein Reboundphänomen zu erreichen, wurde dem Mutterschaf die Gestagenquelle entnommen und eine Superovulation mittels Choriongonadotropin (Intervet, München, Deutschland) ausgelöst. Der Bock wurde 24 Stunden zum Schaf gelassen, um so einen genauen Empfängnisternin bestimmen zu können. Durch Analyse der Progesteronwerte wurde eine Trächtigkeit geprüft. Beim Pavian erfolgt die terminierte Verpaarung ohne hormonelle Stimulation.

4.4.2 Untersuchung der Ontogenese von GLUT1 und GLUT3

Es wurden histologische Untersuchungen an 41 Schaffeten der Rasse Merino-Schwarzkopf in verschiedenen Gestationsaltern durchgeführt.

Bei einer Trächtigkeitsdauer von 150 Tagen, wurden fetale Schafgehirne zum Zeitpunkt 0.27, 0.4, 0.53, 0.63, 0.73 und 0.87 histologisch aufgearbeitet (siehe Tab. 1). Zum ausgewählten Gestationszeitpunkt wurden die Feten dazu per Sectio entwickelt und deren Gehirne zur histologischen Bearbeitung entnommen und fixiert (siehe Punkt 4.4.6).

Bei den Untersuchungen zur Ontogenese waren die Mutterschafe und Feten nicht instrumentiert.

4.4.3 Chirurgische Instrumentierung

Vor der Untersuchung der Betamethasoneffekte wurden die Schaffeten instrumentiert. Vor der sterilen Instrumentierung der Schaffeten wurde eine Nahrungskarenz von 24 Stunden eingehalten. Als Prämedikation erhielten die Mutterschafe 1 g Ketamin (Ketamin-ratiopharm 50, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) intramuskulär und 2,5 g Atropin (Atropinsulfat, B. Braun, Melsungen, Deutschland) intravenös injiziert. Die Mutterschafe wurden mittels Maske bei 4% Halothankonzentration (Fluothan, Zeneca, Wedel, Deutschland) in 100% Sauerstoff narkotisiert und relaxiert sowie anschließend intubiert. Die Halothanerhaltungsdosis lag bei 2% in 100% Sauerstoff. Den Mutterschafen wurde zur Analgetika- und Antibiotikamedikation ein zentraler Venenkatheter in die linke Vena jugularis externa und zur Blutgasanalyse bzw. arteriellen Blutdruckmessung ein zentralarterieller Katheter in die rechte Arteria carotis communis gelegt. Durch einen abdominalen Median- und anschließenden Uterusschnitt wurden die Schaffeten entwickelt. Den Feten wurde die rechte Vena jugularis externa freipräpariert und zum Zwecke der späteren Verabreichung synthetischer Glukokortikoide ein zentraler Polyvinyl-Venenkatheter angelegt. In gleicher Weise wurde die linke Arteria carotis communis der Feten freipräpariert und mit einem Polyvinylkatheter katheterisiert, um hier den fetalen arteriellen Blutdruck zu messen und Blutgasanalysen durchführen zu können. Der fetale arterielle Blutdruck wurde mittels Amnionkatheter auf den hydrostatischen Druck und damit die Höhe des Transducers korrigiert. Nach der Instrumentierung wurden die Feten in den Uterus rückverlagert und dieser mittels Rückstichnaht nach Donati verschlossen. Anschließend erfolgte der Verschluss der Bauchdecke der Mutterschafe in Form einer Einzelknopfnah.

Zur postoperativen Schmerzbekämpfung erhielten die Tiere über drei Tage zwölfstündlich eine zentralvenöse Dosis von $30 - 50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KG}^{-1}$ Metamizol (Berlosin injekt, Berlin-Chemie, Berlin, Deutschland). Zur Infektionsprophylaxe bekam das Mutterschaf eine Tagesdosis von 1 g Ampicillin (Ampicillin, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) und 150 mg Gentamycin (Gentamicin, aniMedica, Senden-Bösensell, Deutschland) zentralvenös und der Fetus 1 g Ampicillin und 50 mg Gentamycin in die Amnionhöhle bis zum zweiten postoperativen Tag verabreicht. Die eingebrachten Katheter wurden mittels Infusionspumpen bei einer

Infusionsrate von 0,5 ml/h kontinuierlich mit Heparin (Liquemin, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland), (12,5 IU/ml in 0,9 prozentigem NaCl) gespült. Das instrumentierte Schaf und das Gesellschaftsschaf wurden postoperativ in speziell gefertigten Tierkäfig-Versuchsboxen versorgt (Bauschlosserei Nöthlich, Gössitz, Deutschland).

4.4.4 Untersuchung akuter Glukokortikoideffekte beim Schaffeten

Es wurden akute Effekte unter einer Glukokortikoidgabe zum Zeitpunkt 0.73 (siehe Tab. 1) eruiert. Dabei wurde Betamethason mütterlich intramuskulär oder direkt fetal intravenös verabreicht. Bei letzterem Applikationsweg sollten unterschiedliche Effekte der menschlichen und ovinen Plazenta (Scheunert 1987) auf die Passage von Betamethason ausgeschlossen werden. Außerdem gibt es Hinweise auf eine differente Glukokortikoidrezeptoraktivierung bei intramuskulärer und intravenöser Applikation (Schwab et al. 2004).

Die Betamethasongabe erfolgte fünf Tage nach Instrumentierung und wurde am Vormittag begonnen. Insgesamt wurden 27 Tiere untersucht.

Maternale intramuskuläre Applikation: Die mit Betamethason behandelten Muttertiere bekamen zweimal vormittags (9.00 Uhr) eine Dosis von $110 \mu\text{g kg}^{-1} \text{KG}^{-1}$ im Abstand von 24 Stunden intramuskulär appliziert. Betamethason wurde als gewichtsadaptierte Dosis eingesetzt und entsprach einer klinisch angewandten Betamethasondosis von zweimal 8 mg zur Förderung der fetalen Lungenreife für eine 70 Kilogramm schwere schwangere Frau. Die Muttertiere der Kontrollgruppe bekamen zweimalig eine 0,9 % NaCl-Lösung im Abstand von 24 Stunden injiziert.

Nach insgesamt 48 Stunden, d.h. 24 Stunden nach der zweiten Applikation, wurden die Feten per Sectio entwickelt, das fetale Gehirn fixiert und entnommen (siehe Punkt 4.4.6).

Fetale intravenöse Infusion: Die mit Glukokortikoiden behandelten Schaffeten erhielten Betamethason mit einer Konzentration von $3,3 \mu\text{g kg}^{-1} \text{KG}^{-1} \text{h}^{-1}$ bei einer kontinuierlichen Laufrate von 1 ml h^{-1} über 48 Stunden verabreicht. Mit der Infusion wurde wiederum am Vormittag 9.00 Uhr begonnen.

Die Kontrollfeten für die fetale intravenöse Applikation von Betamethason erhielten eine 0,9 % NaCl-Lösung über die Vena jugularis externa mit einer kontinuierlichen Laufrate von 1 ml h^{-1} über 48 Stunden infundiert.

Nach Ablauf der 48-stündigen Infusion erfolgte die Darstellung der Feten durch Sectio der Mutterschafe mit anschließender Entnahme der fetalen Gehirne zur histologischen Aufarbeitung (siehe Punkt 4.4.6).

4.4.5 Untersuchung chronischer Glukokortikoideffekte beim Schaffeten

In diesem Teil der Untersuchungen wurden fetale Schafgehirne histologisch untersucht, die an zwei definierten Zeitpunkten der Gestation (0.69 und 0.73 der Gestation) eine Betamethasonapplikation erhielten (siehe Tab. 1). Dabei sollte die Reversibilität der Betamethasoneffekte untersucht werden. Betamethason wurde dazu in zwei Behandlungszyklen zweimal im Abstand von einer Woche verabreicht.

Insgesamt wurden 13 Tiere untersucht. Die Applikation von Betamethason erfolgte gewichtsadaptiert. Die mit Glukokortikoiden behandelten Muttertiere bekamen zum Zeitpunkt 0.69 und 0.73 jeweils zweimal eine Betamethasondosis von $110 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ KG}^{-1}$ am Vormittag 9.00 Uhr im Abstand von 24 Stunden intramuskulär injiziert. Die Mutterschafe der Kontrollgruppe bekamen zum Zeitpunkt 0.69 und 0.73 jeweils zweimal eine 0,9% NaCl-Lösung im Abstand von 24 Stunden intramuskulär injiziert.

Zum Zeitpunkt 0.87 erfolgte die Entwicklung der Schaffeten per Sectio mit anschließender Perfusionsfixierung (siehe Punkt 4.4.6) der fetalen Gehirne zur weiteren histologischen Bearbeitung.

4.4.6 Gewinnung der fetalen Schafgehirne

Am Ende des medikamentösen Versuchsprotokolls erfolgte die Perfusionsfixierung der fetalen Schafgehirne.

Hierzu wurde das Mutterschaf mit 1 g Ketamin prämediziert, die Anästhesie mittels 4% Halothankonzentration in 100% Sauerstoff eingeleitet und fortgesetzt, die Bauchdecke mit einem Medianschnitt eröffnet und ein Uterusschnitt zur Entwicklung des Feten unternommen. Nach Entwicklung des Feten erfolgte die Punktion dessen linker Arteria carotis communis, in die ein kopfwärts gerichteter Katheter eingeführt wurde. Anschließend wurden die Hirngefäße über den eingebrachten Katheter mit heparinisierte physiologischer Kochsalzlösung blutleer gespült. Sowohl der Schaffetus, als auch das Mutterschaf befanden sich während des Fixierungsvorganges in tiefer Halothannarkose. Nachdem die Hirngefäße blutleer waren, wurde das fetale Gehirn 10 Minuten lang über die A. carotis communis mit einer 4% Formalinlösung gespült und damit fixiert, um anschließend den Schädel zu eröffnen und das Gehirn zu entnehmen. Weiterhin wurde das Gehirngewicht bestimmt. Das Mutterschaf wurde nach Beendigung des Vorganges mit einer intravenösen 16% Pentobarbitalinfusion (Narcoren, Aventis, Frankfurt, Deutschland) eingeschläfert.

4.5 Experimentelles Protokoll zu Untersuchungen akuter Betamethasoneffekte auf GLUT1 und GLUT3 am nichtmenschlichen Primaten

Um einen engen Bezug zum Menschen herzustellen, wurden auch nichtmenschliche Primaten untersucht. Daher wurde eine Glukokortikoidbehandlung an trächtigen Pavianen (Gelber Pavian) durchgeführt und anschließend das fetale Gehirn histologisch untersucht. Die Experimente, d.h. Unterbringung und Vorbereitung der Paviane, medikamentöse Behandlung und Fixierung der Gehirne durch Perfusion mit 4% Formalinlösung, fanden am Laboratory for Pregnancy and Newborne Research, College of Veterinary Medicine, Cornell University, USA statt.

Insgesamt wurden 15 Tiere untersucht. Bei einer Trächtigkeitsdauer von 180 Tagen bekamen die Muttertiere der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 0.73 am Vormittag viermal im Abstand von 12 Stunden eine 0,9% NaCl-Lösung intramuskulär injiziert.

Pavianweibchen, die mit Glukokortikoiden behandelt wurden, bekamen viermal eine Betamethasondosis (Celestone phosphate, Schering, Kenilworth, USA) von $87,5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{KG}^{-1}$ im Abstand von 12 Stunden intramuskulär appliziert.

Diese gewichtsadaptierte Dosis entsprach wiederum 8 mg Betamethason pro Tag für eine 70 Kilogramm schwere schwangere Frau.

Die Plazentagängigkeit der Pavianplazenta für Glukokortikoide ist dabei der humanen Plazenta ähnlich (Gitau et al. 1998).

Zwölf Stunden nach Applikation der vierten Betamethasondosis erfolgte die Prämedikation durch intramuskulärer Anwendung von $7,5 \mu\text{g Kg}^{-1}$ Körpergewicht Buprenorphin (Buprenorphin, Reckitt & Coleman, Richmond, USA) und $1,25 \mu\text{g Kg}^{-1} \text{KG}^{-1}$ Glycopyrrolat (Glycopyrrolat, Robinul Baxter, Deerfield, USA). Weiterhin bekamen die zu operierenden Tiere 10 bis 15 mg kg^{-1} Körpergewicht Ketamin intramuskulär verabreicht. Die Narkotisierung und Relaxierung der Paviane wurde mittels 3% Halothanmaske in 100% Sauerstoff eingeleitet und mit einer Halothanerhaltungsdosis von 1,5% in 100% Sauerstoff fortgesetzt. Im weiteren Verlauf erfolgte die Entwicklung der Pavianfeten mittels Sectio und folgender Perfusion mit einer 4% Formalinlösung und anschließender Entnahme der fetalen Gehirne zur histologischen Untersuchung analog zum Vorgehen beim fetalen Schaf (siehe Punkt 4.4.6). Nach Vernähung des Uterus und der Bauchdecke erholten sich die Pavianweibchen in speziellen Käfigen. Dabei wurde eine intramuskuläre Schmerzmedikation über drei Tage mit $15 \mu\text{g kg}^{-1} \text{KG}^{-1}$ Buprenorphin einmal am Tag durchgeführt. Zur Infektionsprophylaxe erhielten die Pavianweibchen zweimal am Tag eine orale Dosis von 30 mg kg^{-1} Körpergewicht Clavamox (Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) über fünf Tage. Nach Genesung kehrten die Muttertiere in ihre Affengruppe zurück.

4.6 Immunhistochemischer Nachweis von Glukosetransportprotein 1 und 3 im fetalen Schaf- und nichtmenschlichen Primatengehirn

4.6.1 Vorbereitung der Objektträger

4.6.1.1 Verwendete Chemikalien

Aceton–Vectabond-Lösung: 70 ml Aceton (Fluka, Buchs, Schweiz)
1 ml Vectabond (Vector Laboratories,
Burlingame , USA)

4.6.1.2 Inkubation der Objektträger

Um eine optimale Haftung der Gehirnschnitte auf den Objektträgern (Menzel, Braunschweig, Deutschland) zu erreichen, wurden diese mittels Vectabond behandelt.

Hierzu wurden die Objektträger für 5 Minuten mit Aceton gewaschen und danach kurz luftgetrocknet. Anschließend kamen die Objektträger für 5 Minuten in eine Aceton–Vectabond-Lösung. Wiederum mussten die Objektträger nach Inkubation kurz luftgetrocknet werden. Danach behandelte man die Objektträger mit Aqua–Dest ca. 30 Sekunden lang. Nach jedem Waschschrift musste das Aqua–Dest ausgetauscht werden. Später trockneten die Objektträger an der Luft.

4.6.2 Schneiden der fetalen Gehirne

Die in Formalin fixierten fetalen Gehirne wurden in Paraffin eingebettet. Nach Einbettung erfolgte das Schneiden zu 7 µm dicken Hirnschnitten mittels Rotationsmikrotom (MICROM, Wallendorf, Deutschland). Anschließend wurden die fetalen Gehirnschnitte auf mit Vectabond vorbehandelte Objektträger aufgezogen.

4.6.3 Immunhistochemische Färbung

4.6.3.1 Verwendete Chemikalien und Arbeitsmittel:

Xylollösung (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Isopropylalkohol 100% (Fluka, Buchs, Schweiz)

Wasserstoffperoxid 30% (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

NaBH₄-Lösung:

50 mg NaBH₄ (SIGMA-ALDRICH, Sternheim, Deutschland)

100 ml Aqua-Dest

Arbeitspuffer:

500 ml PBS (Life Technologies, Paisley, Großbritannien)

2,5 g Albumin, Bovine (SIGMA-ALDRICH, Sternheim, Deutschland)

250 µl Tween (SIGMA-ALDRICH, Sternheim, Deutschland)

Arbeitspuffer/Triton-Lösung:

10 ml Arbeitspuffer

5 µl Triton-X-100 (SIGMA-ALDRICH, Sternheim, Deutschland)

Arbeitspuffer/Triton/Ziegenserum-Lösung:

10 ml Arbeitspuffer/Triton-Lösung

150 µl Ziegenserum (SIGMA-ALDRICH, Sternheim, Deutschland)

ABC-Komplex:

ABC KIT (Linaris Biologische Produkte, Wertheim, Deutschland)

20 µl Lösung A aus ABC KIT

20 µl Lösung B aus ABC KIT

1 ml Arbeitspuffer/Triton-Lösung

METHODIK

Primäre Antikörper:

Kaninchen Anti-GLUT1 (Chemicon International, Temecula, USA)

(1:1500 verdünnt in Arbeitspuffer/Triton/Ziege-Lösung)

Kaninchen Anti-GLUT3 (Chemicon International, Temecula, USA)

(1: 300 verdünnt in Arbeitspuffer/Triton/Ziege-Lösung)

Sekundärer Antikörper:

Anti-Kaninchen-IgG (Linaris Biologische Produkte, Wertheim, Deutschland)

(1 : 200 verdünnt in in Arbeitspuffer/Triton/Ziege-Lösung)

DAB – Immunfärbelösung:

0,7 mg/ml DAB (SIGMA-ALDRICH, Sternheim, Deutschland)

0,2 mg/ml Wasserstoffperoxid

Haematoxylin (Fluka, Buchs, Schweiz)

Neo-Mount (MERCK, Darmstadt, Deutschland)

Pipette (Eppendorf-Pipette, Eppendorf, Deutschland)

Deckgläser (Menzel, Braunschweig, Deutschland)

4.6.3.2 Ablauf der immunhistochemischen Färbung

Zum Nachweis von GLUT1 bzw. GLUT3 im fetalen Pavian- und Schafgehirn wurde eine immunhistochemische Färbung gemäß der ABC-Methode durchgeführt. Der ABC-Methode liegt eine Immunoenzymprozedur zur Lokalisierung von Antigenen zugrunde. Die ABC-Technik ist für die Anwendungen an Formalin fixierten Paraffinschnitten gut geeignet. Für diese Technik wird ein spezifischer erster monoklonaler Antikörper, der beispielsweise gegen GLUT1 und GLUT3 gerichtet ist, verwendet. Ein zweiter biotinylierter Antikörper geht anschließend eine starke Bindung mit dem ersten Antikörper ein. Die entstandene Verbindung kann mittels des DAB sichtbar gemacht werden.

Nach Entparaffinierung in der absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte in PBS überführt.

Um eine unspezifische Färbereaktion zu verhindern, erfolgte eine Blockierung endogener Peroxidasen im Gehirnschnitt. Hierzu wurde 1 ml mit einer 30% Wasserstoffperoxidlösung in 100 ml einer 50% Alkohollösung gegeben und die Schnitte in dieser Lösung für 20 Minuten inkubiert. Danach wurden die Gehirnschnitte für 10 Minuten in einer Aqua–Dest–Lösung gespült.

Nach diesem Schritt wurden die Gehirnschnitte mit einer NaBH_4 –Lösung für 20 Minuten inkubiert, danach jeweils für fünf Minuten mit Aqua–Dest und PBS–Puffer bzw. Arbeitspuffer gespült. In diesem Schritt erfolgte die Inhibition reaktiver Aldehydgruppen.

Im weiteren Verlauf wurden die Objektträger mit der Arbeitspuffer/Triton/Ziege–Lösung bei 37°C für 30 Minuten behandelt. Dieser Schritt erfolgte, um unspezifische Bindungsplätze zu besetzen.

Den Schnitten wurde nun der primäre Antikörper mit einem Arbeitspuffer/Triton/Ziege–Lösung im Verhältnis 1 : 1500 für GLUT1 bzw. 1 : 300 für GLUT3 zugegeben und dann bei 4°C für 12 Stunden inkubiert.

Nach 12 Stunden Inkubationszeit wurden die Objektträger mehrfach gespült, um ungebundene monoklonale Antikörper zu beseitigen.

Danach wurde den Gehirnschnitten der sekundäre Antikörper mit der Arbeitspuffer/Triton/Ziege–Lösung im Verhältnis 1 : 200 zugesetzt und diese für zwei Stunden bei 37°C behandelt. Anschließend mussten die Objektträger mit einer Arbeitspuffer/Triton–Lösung mehrfach gespült werden. Im nächsten Schritt wurden die Gehirnschnitte mit dem ABC–Komplex für 60 Minuten bei 37°C versetzt und mit einer Arbeitspuffer/Triton–Lösung, danach zweimal mit PBS und mit Aqua–Dest für jeweils fünf Minuten gespült.

Zur immunhistochemischen Darstellung wurden die Präparate mittels DAB angefärbt. Darauffolgend wurden die Schnitte zweimal mit Aqua–Dest für jeweils fünf Minuten gespült und anschließend mit Hämatoxylin 8 Minuten gefärbt. Anschließend wurde unter mäßig fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gewässert.

Im letzten Schritt wurde eine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt, um die gefärbten Schnitte zu dehydrieren.

Die gefärbten Schnitte auf den Objektträgern wurden danach mittels Deckgläsern in Neo-Mount eingedeckelt und konserviert.

4.6.4 Lichtmikroskopische Auswertung und Quantifizierung der Immunfärbung

Zur Auswertung wurden die Hirnschnitte mittels Lichtmikroskop AXIOSKOP (Zeiss Optik, Jena, Deutschland) bei einer 150-fachen Vergrößerung fokussiert und repräsentative Ausschnitte der zu untersuchenden Hirnregion (siehe unten) eingestellt. Diese Ausschnitte wurden dann mittels einer 3 CCD Farbvideokamera (SONY MC 3215) digitalisiert, abgespeichert und mit Hilfe eines Bildverarbeitungssystems (Scion Image 1,62 NIH, USA) quantifiziert. Die Farbbilder wurden in Schwarz-Weiß-Bilder umgewandelt, deren Grauwerte sich in einer Skala von 0 bis 256 bewegen. Im Bildverarbeitungssystem wurde die mittlere optische Dichte der GLUT1- und GLUT3-Immunreaktivität (IR) in einem Bildausschnitt von 0,6 mm² erfasst (Gschanes et al. 2000).

Bei den Untersuchungen zur Ontogenese (0.27, 0.4, 0.53, 0.63, 0.73 und 0.87) wurden im sich in Bildung befindlichen frontalen Kortex die GLUT1-IR im Endothel von mindestens 30 zerebralen Mikrogefäßen und die GLUT3-IR in den Neuronen gemessen. Zusätzlich wurden die sich im Bildausschnitt befindlichen Blutgefäße gezählt, um ein Maß für die Gesamtmenge von GLUT1, welches ausschließlich im Gefäßendothel exprimiert wird, im fetalen Gehirn zu bilden. Dazu wurde der Quotient aus Anzahl der Gefäße zur mittleren Dichte der GLUT1-IR im Gefäßendothel berechnet.

Bei den Untersuchungen zu den Betamethasoneffekten wurde der frontale Kortex, das Striatum und der Hippokampus ausgewertet. Im frontalen Kortex wurde in den anatomischen Schichten 3 bis 5 gemessen, im Hippokampus in der CA1- und CA3-Region.

Die Messung der Grauwerte von GLUT1 und GLUT3 beim Pavian erfolgte ausschließlich im frontalen Kortex, hier wiederum in den anatomischen Schichten 3 – 5.

METHODIK

Um eine subjektive Beeinflussung der Messergebnisse zu vermeiden, fanden alle Messungen der Immunmarkierung als Einfachblindversuch statt. Die evaluierten Werte wurden mit Standardabweichung und Mittelwertabweichung dargestellt.

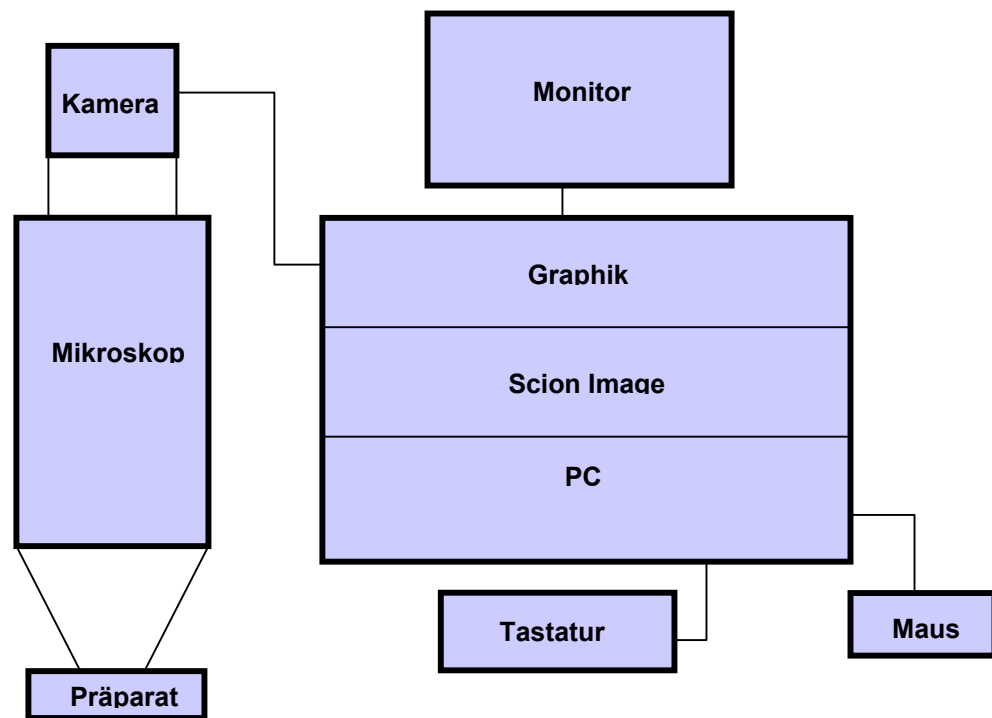


Abb. 2:
Blockschaltbild Computerarbeitsplatz

4.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse der erhobenen Daten innerhalb der Gruppen (Ontogenese von GLUT1 und GLUT3, Änderungen der physiologischen Parameter über die Zeit) verwendeten wir den Wilcoxon-Test (Wilcoxon 1945, Mann et al. 1947).

Akute und chronische Betamethasoneffekte auf GLUT1 und GLUT3 und die physiologischen Parameter wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test überprüft (Wilcoxon 1945, Mann et al. 1947).

Wir verwendeten die nichtparametrischen Tests, da aus der Erfahrung die immunhistochemischen Parameter nicht normal verteilt sind und wir eine Normalverteilung nicht überprüften. Außerdem ist der Mann-Whitney-U-Test unempfindlich gegen Varianzunterschiede und wird auch bei geringen Fallzahlen empfohlen (Siegel 1985). Eine exakte Prüfung auf Normalverteilung mit dem Kolmogorow-Smirnow-Anpassungstest war aufgrund der geringen Fallzahl nicht möglich (Jones et al. 1980).

Aufgrund der multiplen Vergleiche bei den Untersuchungen zur Ontogenese wurde eine Bonferroni-Adjustierung durchgeführt, um das Fehlentscheidungsrisiko (alpha-Fehler) zu minimieren. Bei den Untersuchungen zur Ontogenese von GLUT1 und GLUT3 wurde Signifikanz zum jeweils jüngeren Alter untersucht. Signifikanz lag dann vor, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug.

5 Ergebnisse

5.1 Expression von GLUT1 und GLUT3 während der Ontogenese

Die Expression von GLUT1 und GLUT3 wurde speziell im sich in Entwicklung befindlichen frontalen Kortex zu den Zeitpunkten 0.27, 0.40, 0.53, 0.63, 0.73 und 0.87 untersucht.

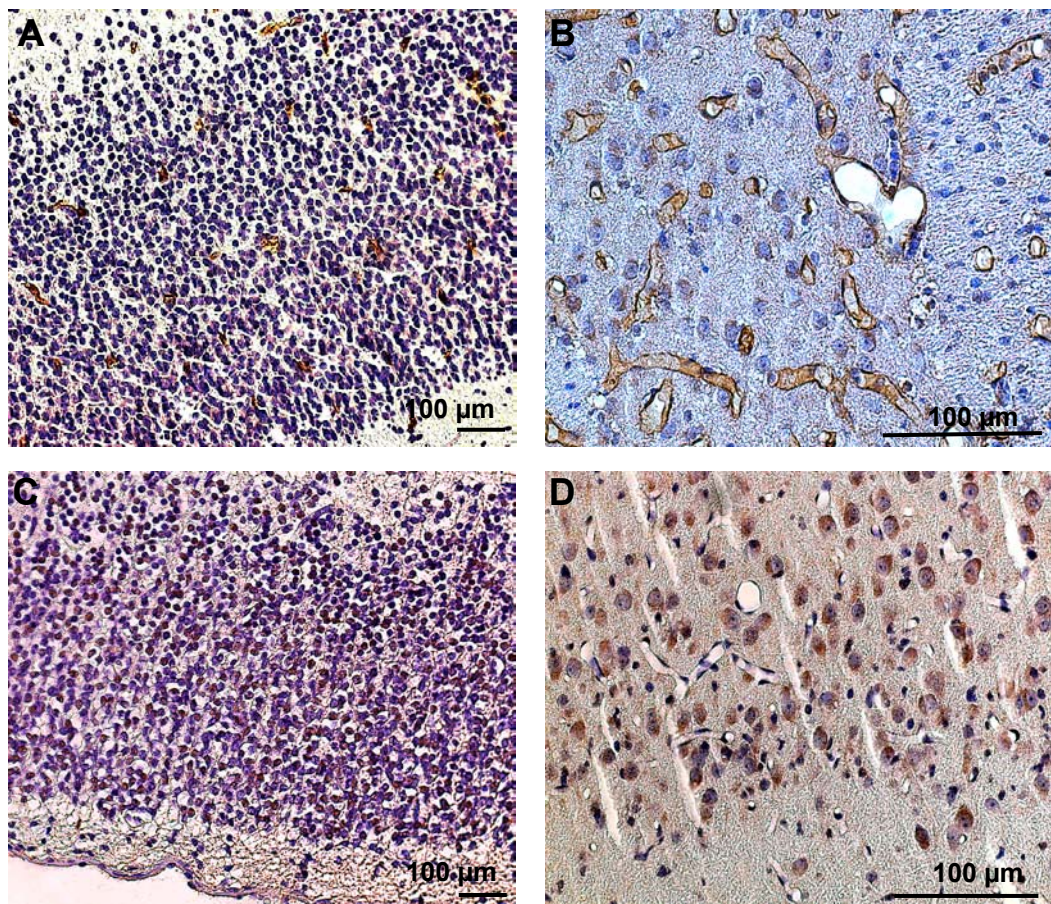


Abb. 3:
Ontogenese von GLUT1 (A,B) und GLUT3 (C,D) beim fetalen Schaf im frontalen Kortex zum Gestationszeitpunkt 0.27 (A,C) und 0.87 (B,D), es wurde die GLUT1-IR im Endothel der zerebralen Mikrogefäße und die GLUT3-IR in der neuronalen Membran dargestellt, Gegenfärbung mit Haematoxylin.

5.1.1 Expression von GLUT1

Mittels immunhistochemischer Färbung konnte eine GLUT1-IR in allen Gestationsaltern nachgewiesen werden. Im untersuchten Entwicklungszeitraum kam es zu einem annähernd linearen Abfall der optischen Dichte im frontalen Kortex von $234,93 \pm 3,12$ zum Gestationszeitpunkt 0.27 auf $181,58 \pm 5,02$ zum Gestationszeitpunkt 0.87, was einem prozentualen Abfall von 22,71% ($p < 0,05$) entsprach (Abb. 4a).

Um eine Aussage über die Gesamtmenge an GLUT1 treffen zu können, welches ausschließlich im Gefäßendothel exprimiert wird, wurden die Gefäße in den mikroskopischen Ausschnitten gezählt. Es zeigte sich ein annähernd linearer Anstieg der im Bildausschnitt vorhandenen Mikrogefäße von $9,28 \pm 0,45$ zum Gestationszeitpunkt 0.27 auf $38,17 \pm 2,44$ zum Gestationszeitpunkt 0.87 ($p < 0,05$) (Abb. 4b).

Die im Bildausschnitt gezählten Mikrogefäße wurden mit der optischen Dichte von GLUT1 ins Verhältnis gesetzt (Abb. 4b). Parallel zum Anstieg der im Bildausschnitt vorhandenen Mikrogefäße stieg auch die Gesamtmenge an GLUT1 in den untersuchten Gestationsaltern annähernd linear an.

In Abb. 3 wurden die Gestationszeitpunkte 0.27 und 0.87 beispielhaft für den Entwicklungsverlauf dargestellt.

ERGEBNISSE

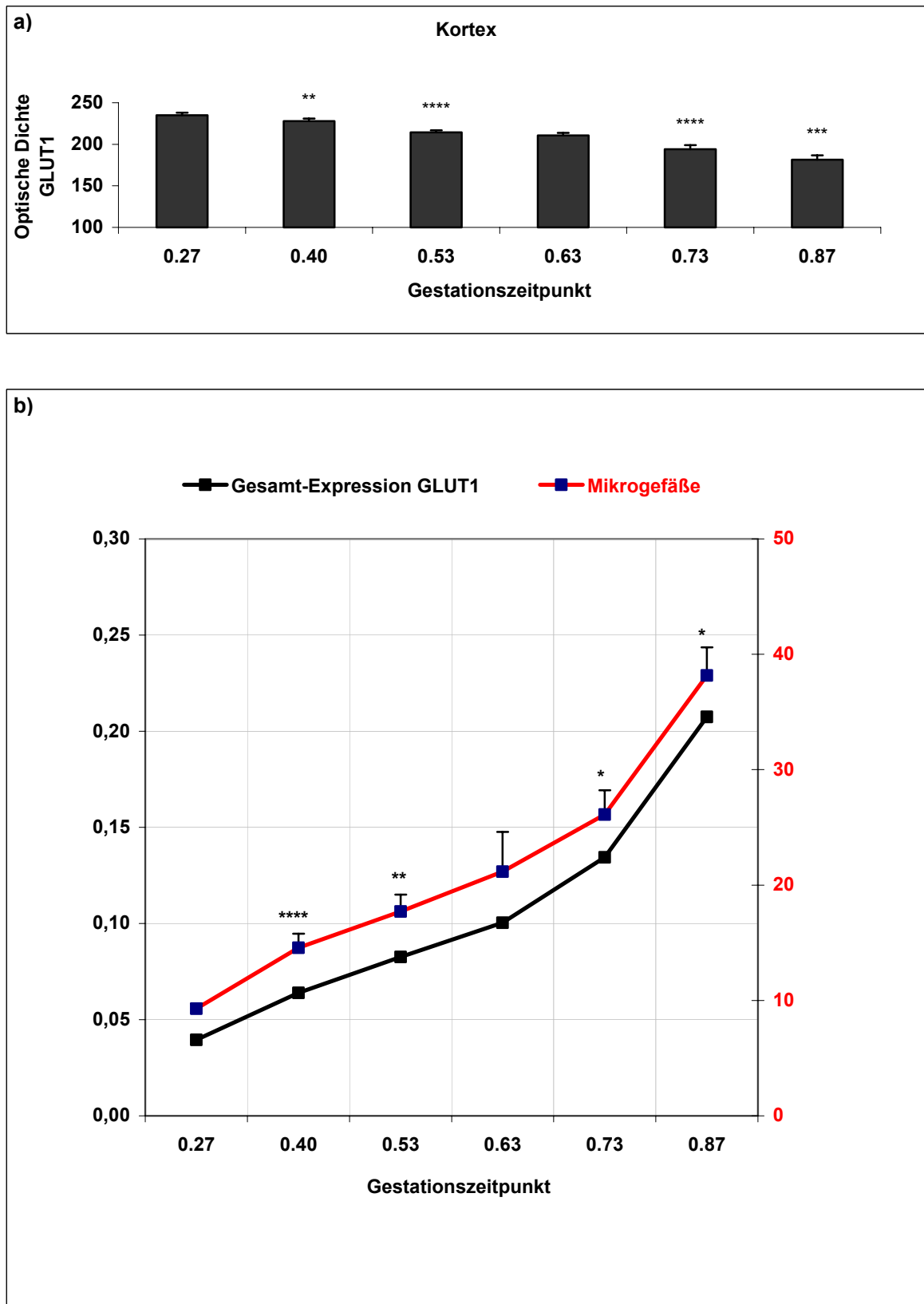


Abb. 4:

a): optische Dichte während der fetalen Hirnentwicklung im frontalen Kortex
b): Anzahl der Mikrogefäße während der fetalen Hirnentwicklung und Darstellung der Gesamtexpression GLUT1 im frontalen Kortex Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ in Bezug zum nächstjüngeren Alter

5.1.2 Expression von GLUT3

Eine GLUT3-IR konnte in allen Gestationsaltern nachgewiesen werden. Die optische Dichte von GLUT3 im frontalen Kortex sank im untersuchten Entwicklungszeitraum annähernd linear von $198,22 \pm 1,93$ zum Gestationszeitpunkt 0.27 auf $161,87 \pm 0,80$ zum Gestationszeitpunkt 0.87, was einem prozentualen Abfall von 18,34% ($p < 0,05$) entsprach (Abb. 5).

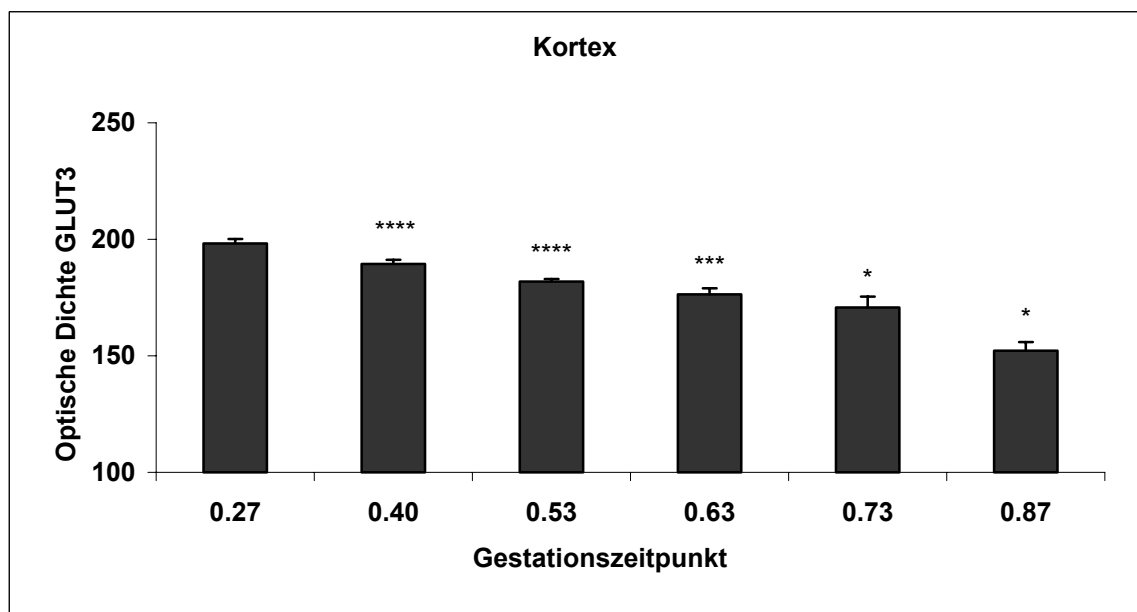


Abb. 5:
optische Dichte während der fetalen Hirnentwicklung im frontalen Kortex, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ in Bezug zum nächstjüngeren Alter

5.2 Akute Glukokortikoideffekte beim Schaffeten

Um akute Effekte einer Betamethasongabe zu untersuchen, erfolgte die Betamethasonbehandlung zum Zeitpunkt 0.73 sowohl intramuskulär bei der Mutter, als auch unter Umgehung der maternalen Plazenta als direkte fetale Infusion.

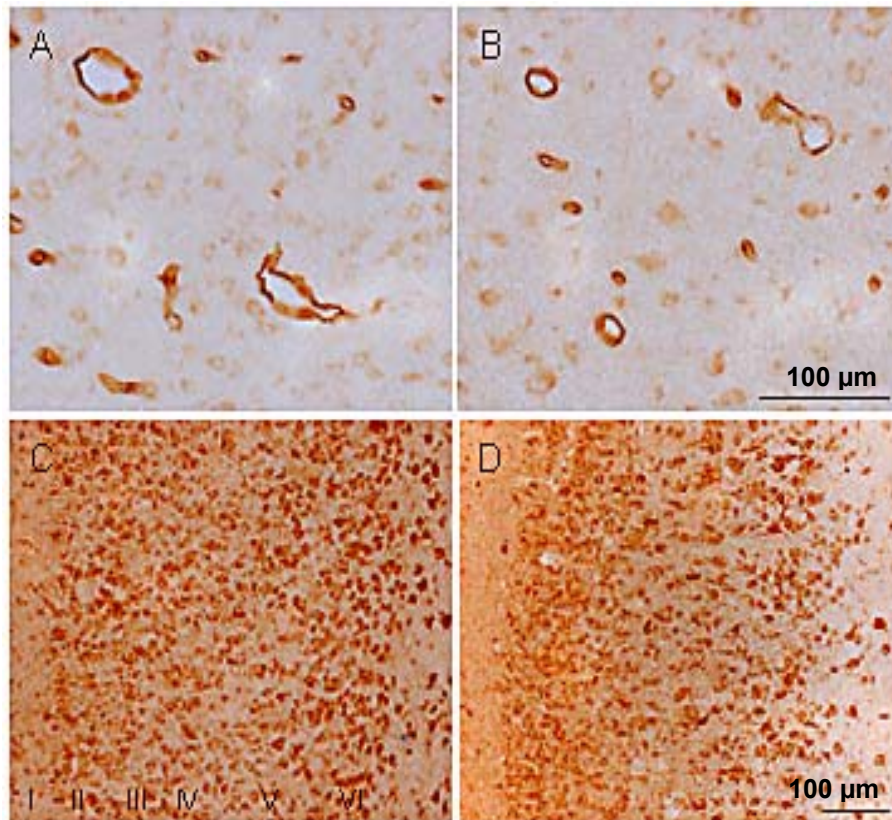


Abb. 6:
Immunhistochemische Verteilung von GLUT1 und GLUT3 im frontalen Kortex des fetalen Schaffeten zum Gestationszeitpunkt 0.73, Kontrolle in (A) und (C), Betamethasonbehandlung in (B) und (D). In (A) und (B) ist die GLUT1-IR selektiv im Gefäßendothel des frontalen Kortex dargestellt. In (C) und (D) ist die GLUT3-IR in der neuronalen Membran dargestellt. In (C) sind zusätzlich die Kortexschichten I bis VI dargestellt.

5.2.1 Physiologische Parameter bei maternalen Applikation

Zur Kontrolle des Gesundheitszustandes von Muttertier und Fetus wurden täglich pH-Wert, PCO₂ und PO₂ bestimmt.

Maternale und fetale Blutgase, sowie pH-Werte unterschieden sich zwischen den Gruppen vor und nach maternalen Betamethasonapplikation nicht (Tab. 2 – 3).

Tab. 2:
pH-Wert und Blutgase der Mutterschafe in Abhängigkeit von einer maternalen Betamethasonbehandlung zum Zeitpunkt 0.73, n_{Kontrolle} = 3, n_{Betamethason} = 3, dargestellt sind Mittelwerte ± SEM

Mutterschafe	pH	PCO ₂	PO ₂
Kontrolltiere			
vor maternalen Applikation	7,45 ± 0,08	38,2 ± 8,47	133,3 ± 7,96
24 h nach maternalen Applikation	7,47 ± 0,07	35 ± 11,16	136,3 ± 1,51
48 nach maternalen Applikation	7,46 ± 0,08	34 ± 9,22	134,9 ± 9,51
Betamethasontiere			
vor maternalen Applikation	7,43 ± 0,06	33,2 ± 4,38	132,8 ± 3,69
24 h nach maternalen Applikation	7,46 ± 0,03	38,1 ± 5,91	131 ± 6,22
48 nach maternalen Applikation	7,45 ± 0,04	39 ± 6,80	132,3 ± 7,64

ERGEBNISSE

Tab. 3:
pH-Wert und Blutgase der Feten in Abhängigkeit von einer maternalen Betamethasonbehandlung zum Zeitpunkt 0.73, $n_{\text{Kontrolle}} = 3$, $n_{\text{Betamethason}} = 3$, dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

Fetus	pH	PCO ₂	PO ₂
Kontrolltiere			
vor maternaler Applikation	7,37 \pm 0,02	44,3 \pm 2,44	25,6 \pm 0,53
24 h nach maternaler Applikation	7,35 \pm 0,00	45,3 \pm 7,09	22,8 \pm 2,67
48 nach maternaler Applikation	7,35 \pm 0,00	40,8 \pm 4,22	25 \pm 3,36
Betamethasontiere			
vor maternaler Applikation	7,35 \pm 0,05	40,8 \pm 1,89	24,6 \pm 3,76
24 h nach maternaler Applikation	7,36 \pm 0,03	45,1 \pm 0,49	23,5 \pm 0,98
48 nach maternaler Applikation	7,39 \pm 0,01	46,6 \pm 1,82	23,2 \pm 2,27

5.2.2 Physiologische Parameter bei fetaler Applikation

Maternale und fetale Blutgase, sowie pH–Werte unterschieden sich zwischen den Gruppen vor und nach fetaler Betamethasonapplikation nicht. (Tab.4 – 5)

Tab. 4:
pH–Wert und Blutgase der Mutterschafe in Abhängigkeit von einer fetalen Betamethasonbehandlung zum Zeitpunkt 0.73, n_{Kontrolle} = 9, n_{Betamethason} = 8, dargestellt sind Mittelwerte ± SEM

Mutterschafe	pH	PCO₂	PO₂
Kontrolltiere			
vor fetaler Applikation	7,48 ± 0,04	33,6 ± 1,52	134 ± 1,49
24 h nach Beginn der Infusion	7,46 ± 0,03	35,5 ± 2,42	136,2 ± 2,73
48 h nach Beginn der Infusion	7,49 ± 0,02	34,6 ± 1,66	135,1 ± 2,21
Betamethasontiere			
vor fetaler Applikation	7,46 ± 0,05	33,9 ± 2,16	134,9 ± 2,25
24 h nach Beginn der Infusion	7,47 ± 0,03	35,6 ± 1,22	136,1 ± 3,11
48 h nach Beginn der Infusion	7,48 ± 0,03	34,6 ± 2,44	135 ± 2,09

ERGEBNISSE

Tab. 5:
pH-Wert und Blutgase der Feten in Abhängigkeit von einer fetalen Betamethasonbehandlung zum Zeitpunkt 0.73, $n_{\text{Kontrolle}} = 9$, $n_{\text{Betamethason}} = 8$, dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

Fetus	pH	PCO ₂	PO ₂
Kontrolltiere			
vor Applikation	7,33 \pm 0,04	44,3 \pm 2,22	27,3 \pm 2,76
24 h nach Beginn der Infusion	7,31 \pm 0,03	44,1 \pm 2,78	25,1 \pm 1,73
48 h nach Beginn der Infusion	7,29 \pm 0,07	41,8 \pm 2,40	25 \pm 2,32
Betamethasontiere			
vor Applikation	7,33 \pm 0,03	44,2 \pm 1,81	29,1 \pm 2,42
24 h nach Beginn der Infusion	7,36 \pm 0,04	43,7 \pm 1,19	25,3 \pm 2,18
48 h nach Beginn der Infusion	7,34 \pm 0,06	43,1 \pm 3,54	27,3 \pm 2,30

5.2.3 Betamethasoneffekte auf die Expression von GLUT1

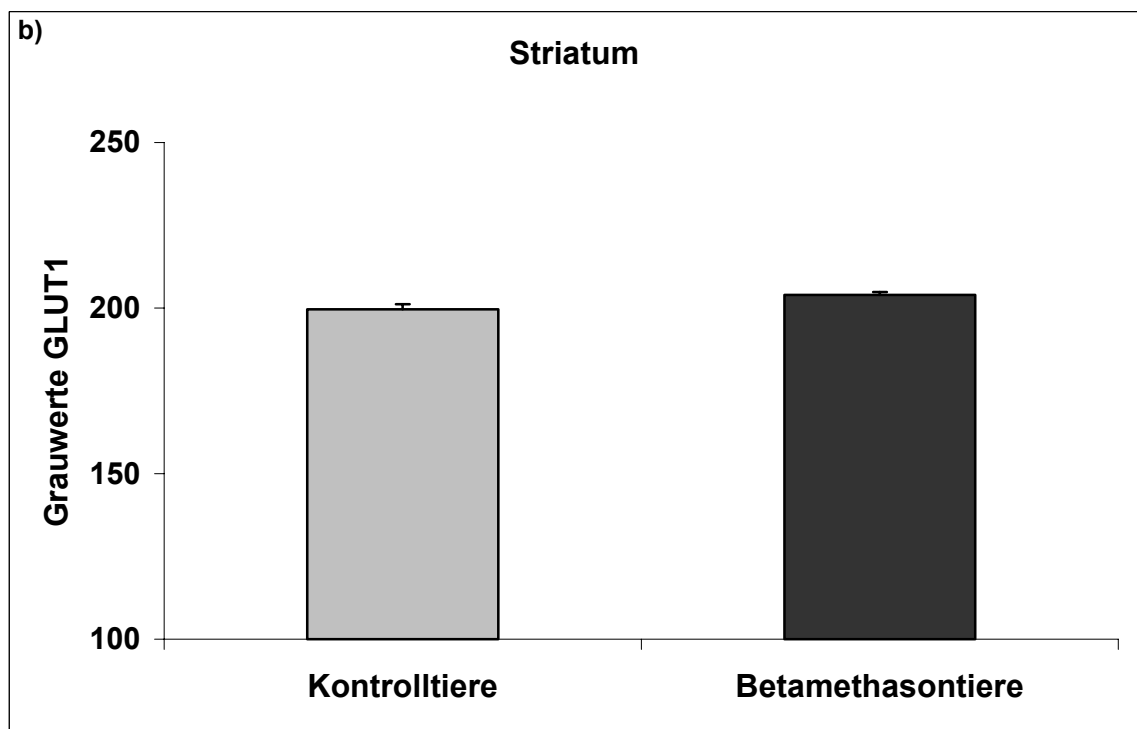
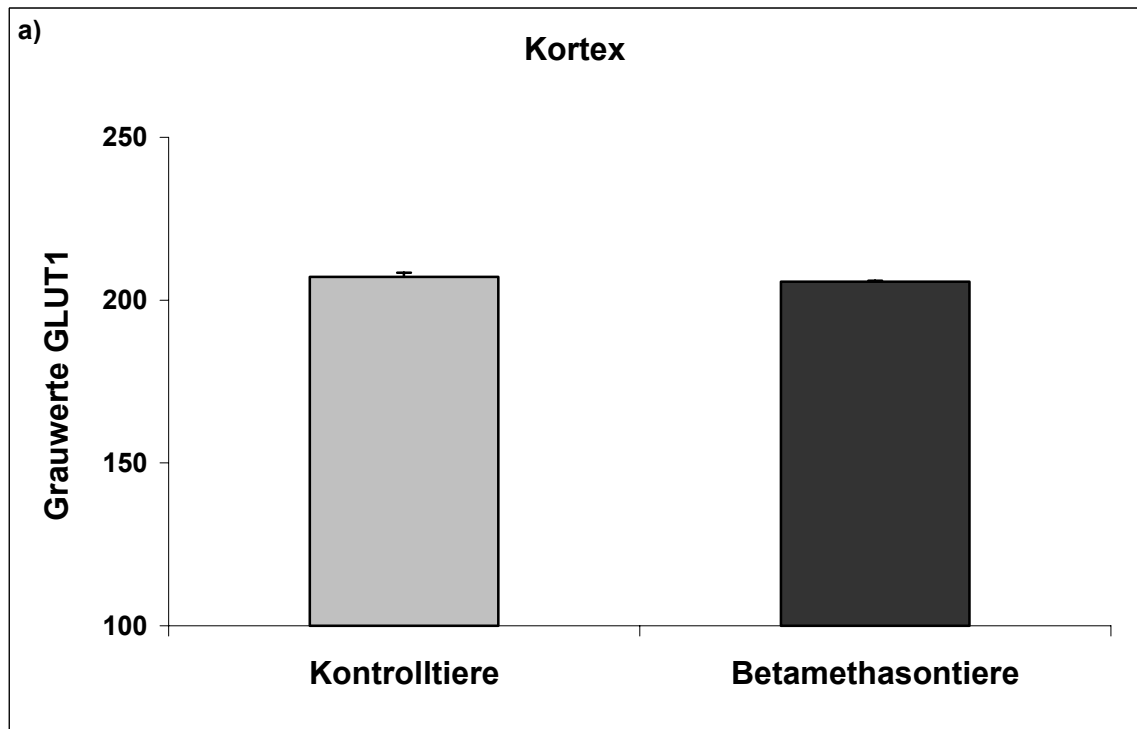
5.2.3.1 Maternale intramuskuläre Injektion

Bei maternaler intramuskulärer Injektion wurde die GLUT1-IR im frontalen Kortex, dem Striatum und im Hippokampus als optische Dichte gemessen.

Im frontalen Kortex wurde eine optische Dichte von $207,10 \pm 1,29$ bei den Kontrolltieren, eine optische Dichte von $205,69 \pm 0,32$ bei den mit Betamethason behandelten Tieren gemessen (Abb. 7a).

Im Striatum wurde eine optische Dichte von $199,59 \pm 1,60$ bei den Kontrolltieren und eine optische Dichte von $204,01 \pm 0,82$ bei den Betamethasontieren gemessen (Abb. 7b).

In der CA1 Region des Hippokampus wurde eine optische Dichte von $208,38 \pm 1,45$ bei den Kontrolltieren bzw. eine optische Dichte von $206,41 \pm 0,97$ bei mit Betamethason behandelten Tieren gemessen. In der CA3 Region betrug die optische Dichte bei den Kontrolltieren $207,33 \pm 0,84$ und bei Betamethasontieren $204,59 \pm 1,10$ (Abb. 7c). Damit hatte die maternale Betamethasonbehandlung keine akuten Effekte auf die Expression von GLUT1 in den untersuchten Hirnregionen.



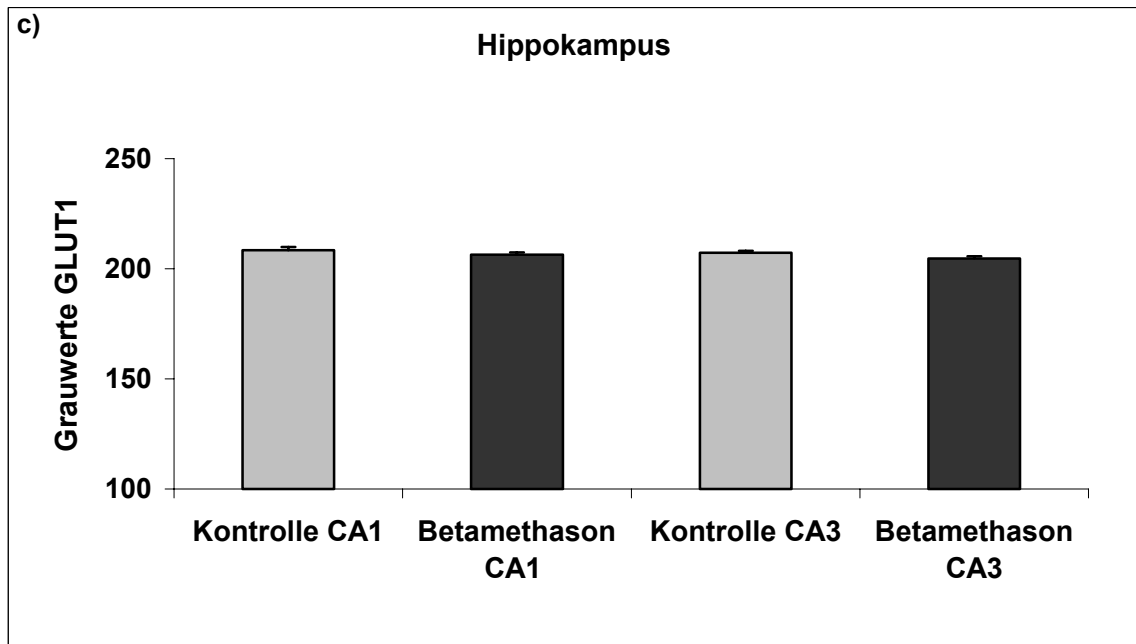


Abb. 7:
GLUT1-IR (optische Dichte) im frontalen Kortex (a), Striatum (b) und der CA1 und CA3 Region des Hippokampus (c) 48h nach einer maternalen NaCl- oder Betamethasonbehandlung zum Gestationszeitpunkt 0.73

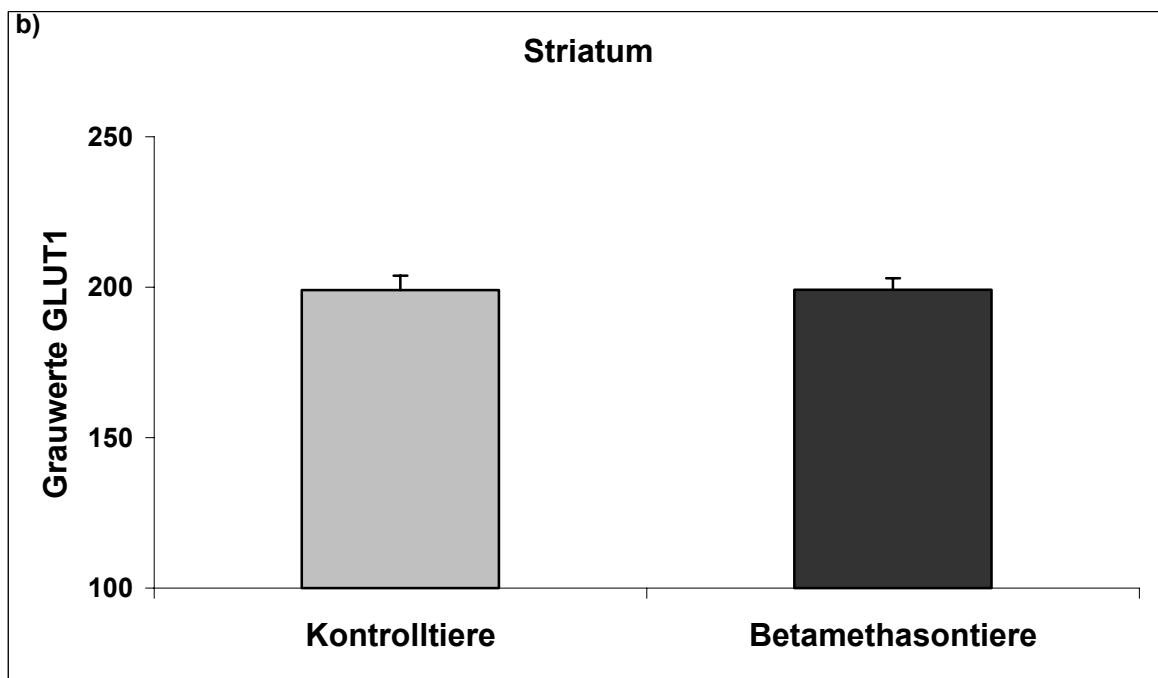
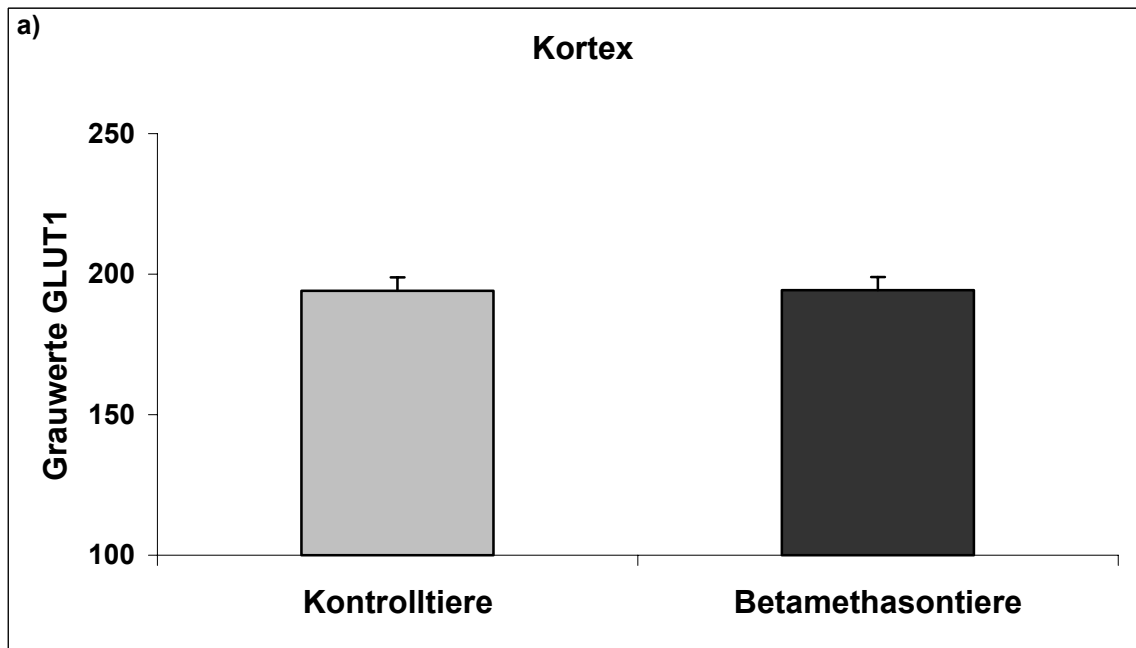
5.2.3.2 Intrauterine fetale Infusion

Bei fetaler intravenöser Injektion wurde die GLUT1-IR im frontalen Kortex, dem Striatum und im Hippokampus als optische Dichte gemessen.

Im frontalen Kortex wurde eine optische Dichte von $194,12 \pm 5,14$ bei den Kontrolltieren und eine optische Dichte von $194,29 \pm 5,31$ bei mit Betamethason behandelten Tieren gemessen (Abb. 8a).

Im Striatum wurde eine optische Dichte von $199,07 \pm 5,05$ bei den Kontrolltieren und bei mit Betamethason behandelten Tieren eine optische Dichte von $199,16 \pm 4,24$ eruiert (Abb. 8b).

In der CA1 Region des Hippokampus wurde bei den Kontrolltieren eine optische Dichte von $204,00 \pm 2,05$, bei Betamethasontieren eine optische Dichte von $206,43 \pm 3,16$ gemessen. In der CA3 Region des Hippokampus wurde eine optische Dichte von $207,60 \pm 1,72$ bei den Kontrolltieren und eine optische Dichte unter Betamethason von $209,19 \pm 1,33$ eruiert (Abb. 8c). Damit hatte die fetale ähnlich wie die maternale Betamethasonbehandlung keine akuten Effekte auf die Expression von GLUT1 in den untersuchten Hirnregionen



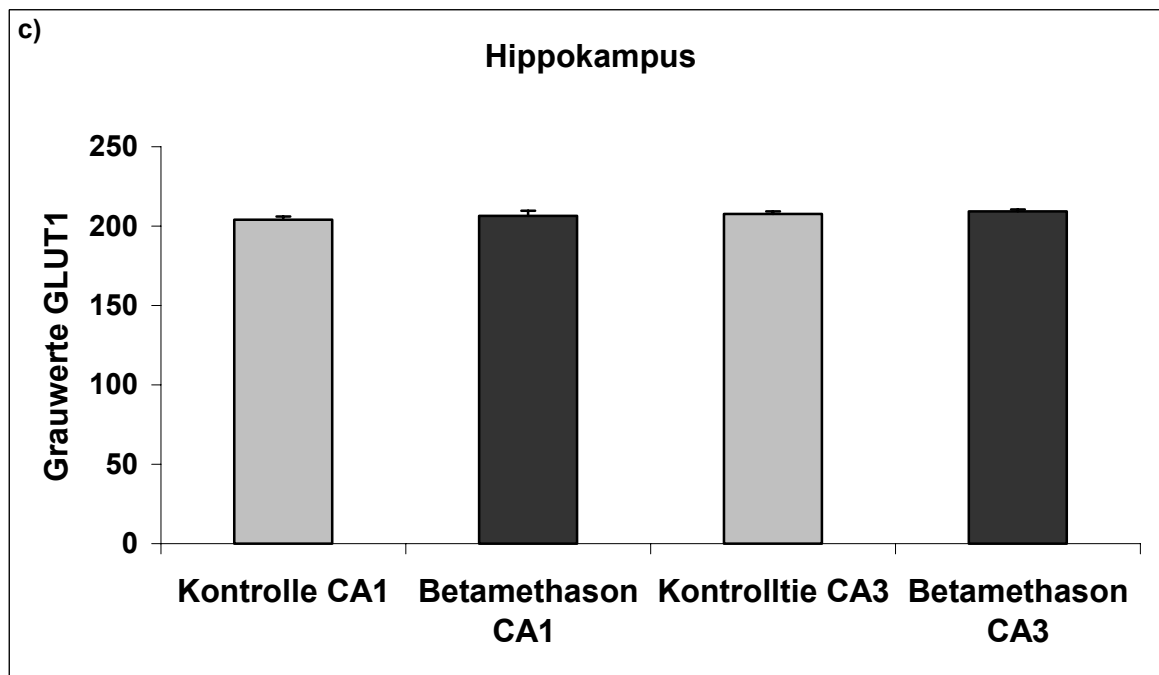


Abb. 8:
GLUT1-IR (optische Dichte) im frontalen Kortex (a), Striatum (b) und der CA1 und CA3 Region des Hippokampus (c) 48h nach einer fetalen NaCl- oder Betamethasonbehandlung zum Gestationszeitpunkt 0.73

5.2.4 Betamethasoneffekte auf die Expression von GLUT3

5.2.4.1 Maternale intramuskuläre Injektion

Bei maternaler intramuskulärer Injektion erfolgte die Messung der GLUT3-IR im frontalen Kortex, dem Striatum und dem Hippokampus.

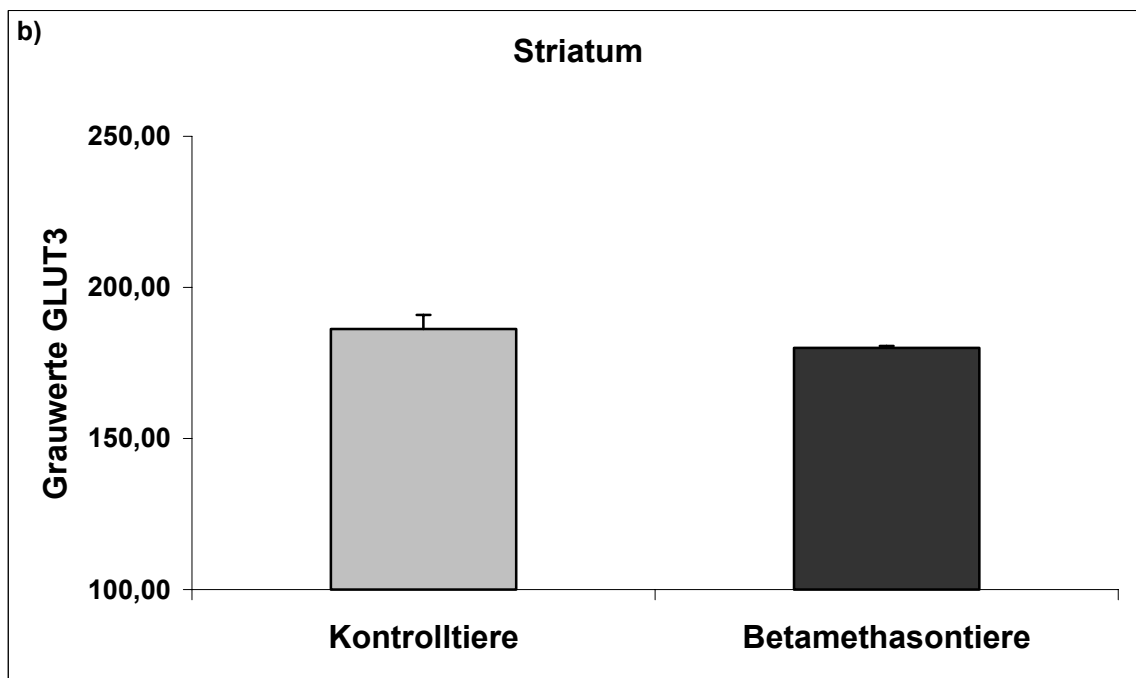
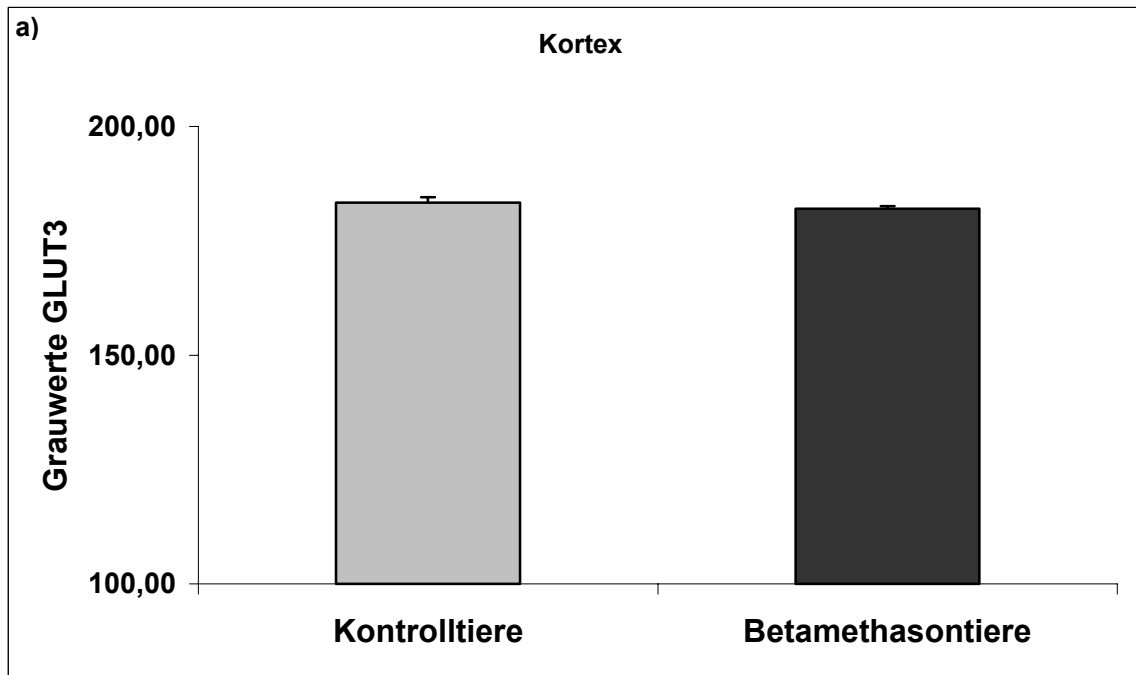
Im frontalen Kortex wurde eine optische Dichte von $183,33 \pm 1,20$ bei den Kontrolltieren, eine optische Dichte von $182,03 \pm 0,56$ bei den mit Betamethason behandelten Tieren gemessen (Abb. 9a).

Im Striatum wurde eine optische Dichte von $186,26 \pm 4,59$ bei Kontrolltieren und eine optische Dichte von $180,01 \pm 0,57$ bei Betamethasontieren gemessen (Abb. 9b).

In der CA1 Region des Hippokampus wurde eine optische Dichte von $174,74 \pm 1,43$ bei den Kontrolltieren bzw. eine optische Dichte von $172,24 \pm 1,17$ bei mit Betamethason behandelten Tieren gemessen. In der CA3 Region betrug die optische Dichte bei den Kontrolltieren $172,49 \pm 0,99$ und bei Betamethasontieren $173,20 \pm 3,19$ (Abb. 9c). Damit hatte die maternale Betamethasonbehandlung

ERGEBNISSE

keine akuten Effekte auf die Expression von GLUT3 in den untersuchten Hirnregionen.



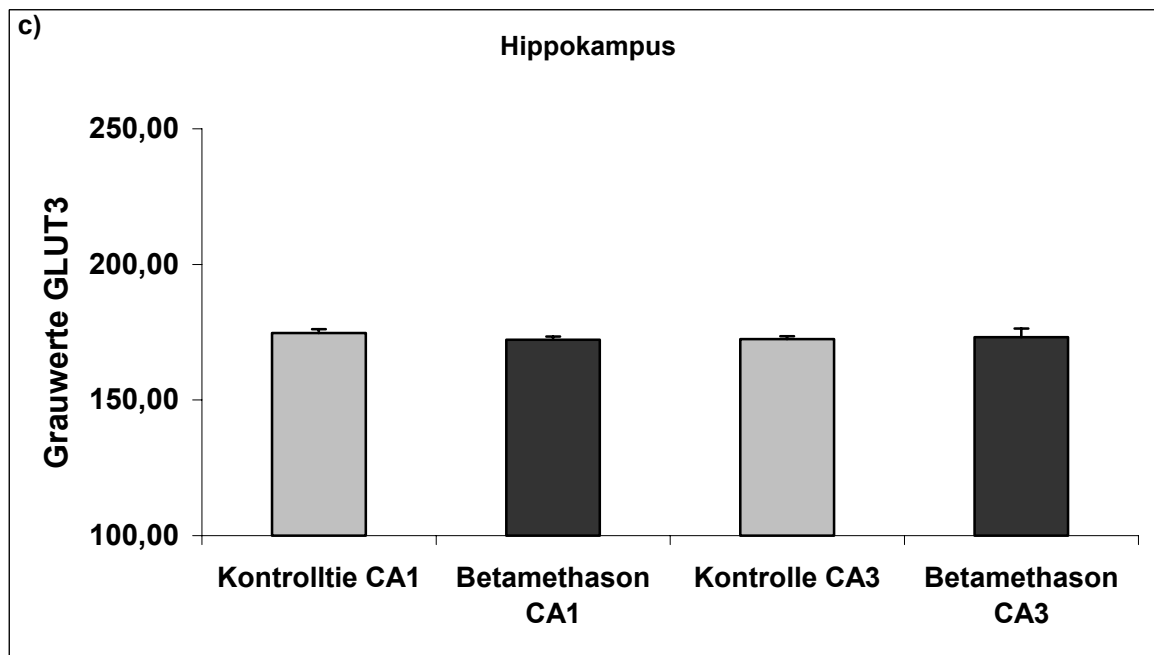


Abb. 9:
GLUT3-IR (optische Dichte) im frontalen Kortex (a), Striatum (b) und der CA1 und CA3 Region des Hippokampus (c) 48h nach einer maternalen NaCl- oder Betamethasonbehandlung zum Gestationszeitpunkt 0.73

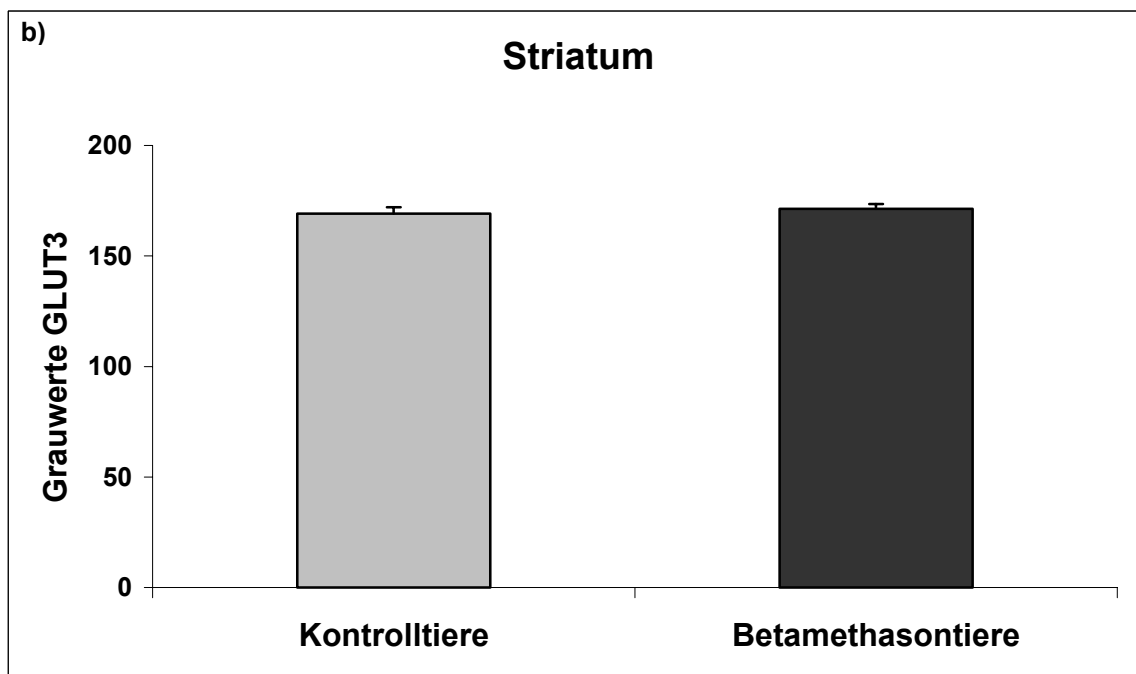
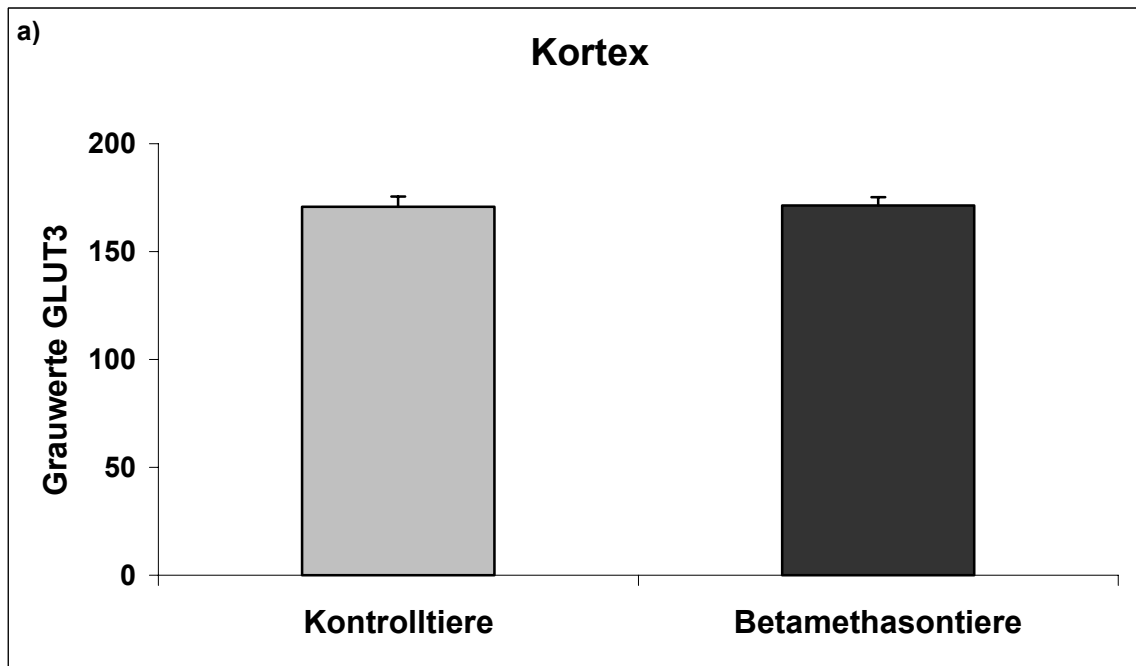
5.2.4.2 Intrauterine fetale Infusion

Bei intravenöser Injektion wurde die GLUT3-IR im frontalen Kortex, dem Striatum und im Hippokampus als Grauwerte gemessen.

Die Messung der optische Dichte im frontale Kortex ergab bei den Kontrolltieren $170,77 \pm 4,71$, bei Betamethasontieren $171,33 \pm 3,85$ (Abb. 10a).

Im Striatum wurde bei den Kontrolltieren eine optische Dichte von $169,14 \pm 2,93$, bei mit Betamethason behandelten Tieren eine optische Dichte von $171,35 \pm 2,11$ gemessen (Abb. 10b).

Im Hippokampus wurde in der CA1 Region eine optische Dichte von $164,18 \pm 4,15$ bei den Kontrolltieren und $160,05 \pm 3,41$ bei Betamethasontieren eruiert. In der hippokampalen CA3 Region wurde bei den Kontrolltieren eine optische Dichte von $165,82 \pm 2,97$ und bei mit Betamethason behandelten Tieren eine optische Dichte von $163,98 \pm 3,82$ erfasst (Abb. 10c). Damit hatte die fetale Betamethasonbehandlung keine akuten Effekte auf die Expression von GLUT3 in den untersuchten Hirnregionen.



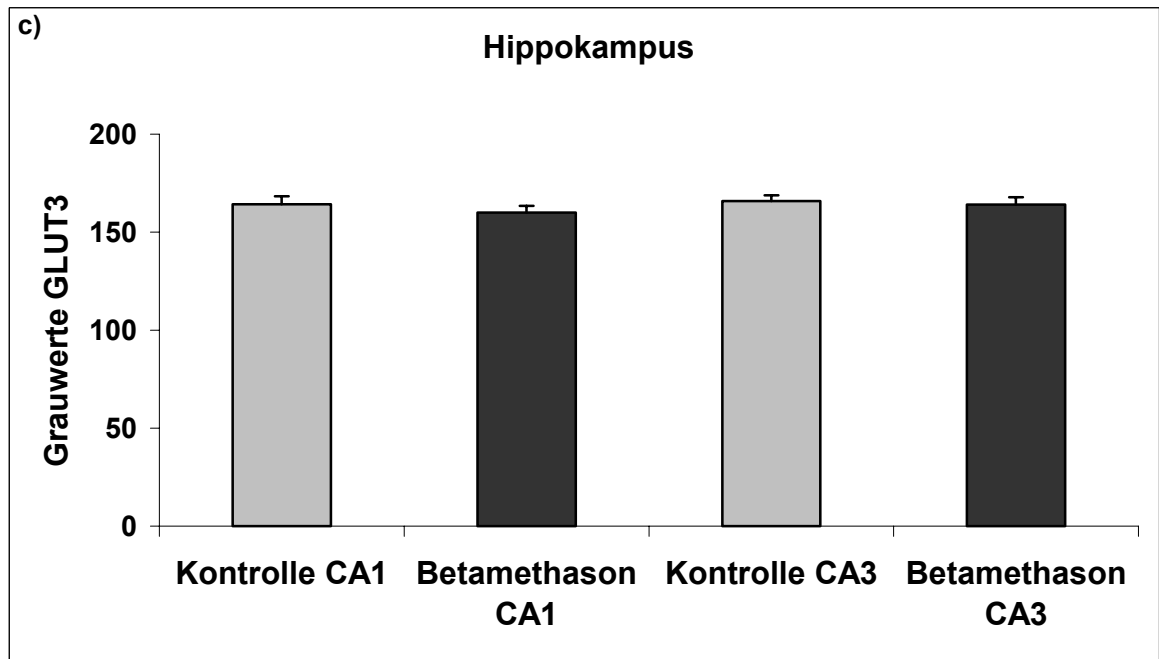


Abb. 10:
GLUT3-IR (optische Dichte) im frontalen Kortex (a), Striatum (b) und der CA1 und CA3 Region des Hippokampus (c) 48h nach einer fetalen NaCl- oder Betamethasonbehandlung zum Gestationszeitpunkt 0.73

5.3 Akute Glukokortikoidwirkungen beim nichtmenschlichen Primaten

Beim nichtmenschlichen Primaten wurde die GLUT1- u. GLUT3-IR im frontalen Kortex zum Gestationszeitpunkt 0.73 gemessen.

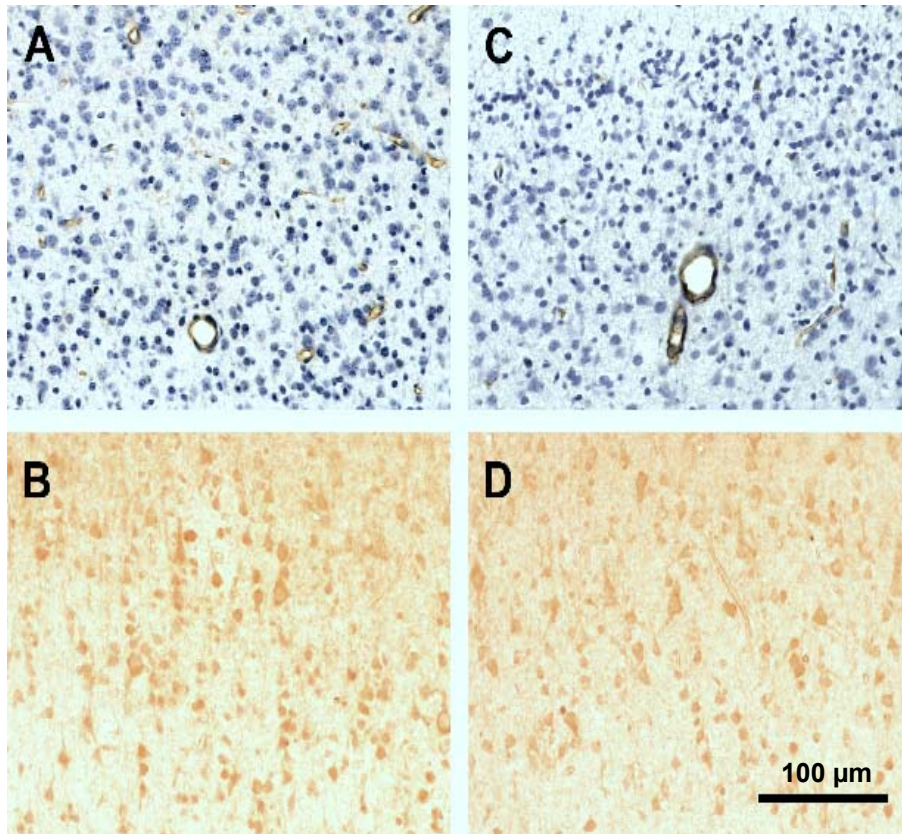


Abb. 11:
Immunhistochemische Verteilung von GLUT1 und GLUT3 im frontalen Kortex des fetalen nichtmenschlichen Primaten zum Gestationszeitpunkt 0.73, Kontrolle in (A) und (B), Betamethasonbehandlung in (C) und (D). In (A) und (C) ist die GLUT1-IR selektiv im Gefäßendothel des frontalen Kortex dargestellt, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. In (B) und (D) ist die GLUT3-IR in der neuronalen Membran dargestellt.

5.3.1 Betamethasoneffekte auf die Expression von GLUT1 und GLUT3

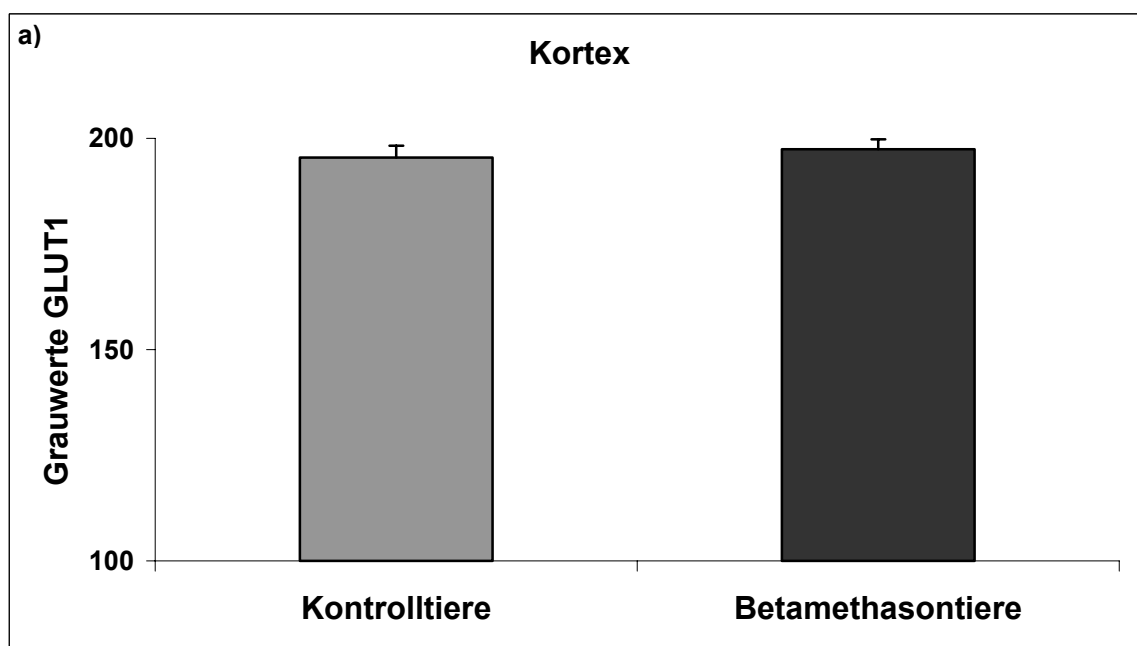
5.3.1.1 GLUT1

Die Expression von GLUT1 beim nichtmenschlichen Primaten war artgemäß ausgeprägt wie beim untersuchten fetalen Schaf im entsprechenden Gestationsalter (0.73, siehe 5.2). Bei den Kontrolltieren wurde eine optische Dichte von $195,47 \pm 2,79$, bei den Betamethasontieren von $197,40 \pm 2,76$ gemessen (Abb. 12a).

5.3.1.2 GLUT3

Auch die Expression von GLUT3 war artgemäß ausgeprägt beim nichtmenschlichen Primaten ähnlich wie beim fetalen Schaf. Es zeigte sich bei den Kontrolltieren eine optische Dichte von $160,59 \pm 4,47$, bei Betamethasontieren eine optische Dichte von $159,35 \pm 4,39$ (Abb. 12b).

Damit hatte wie bei den Schafen die maternale Betamethasonbehandlung keine akuten Effekte auf die Expression von GLUT1 und GLUT3 im frontalen zerebralen Kortex.



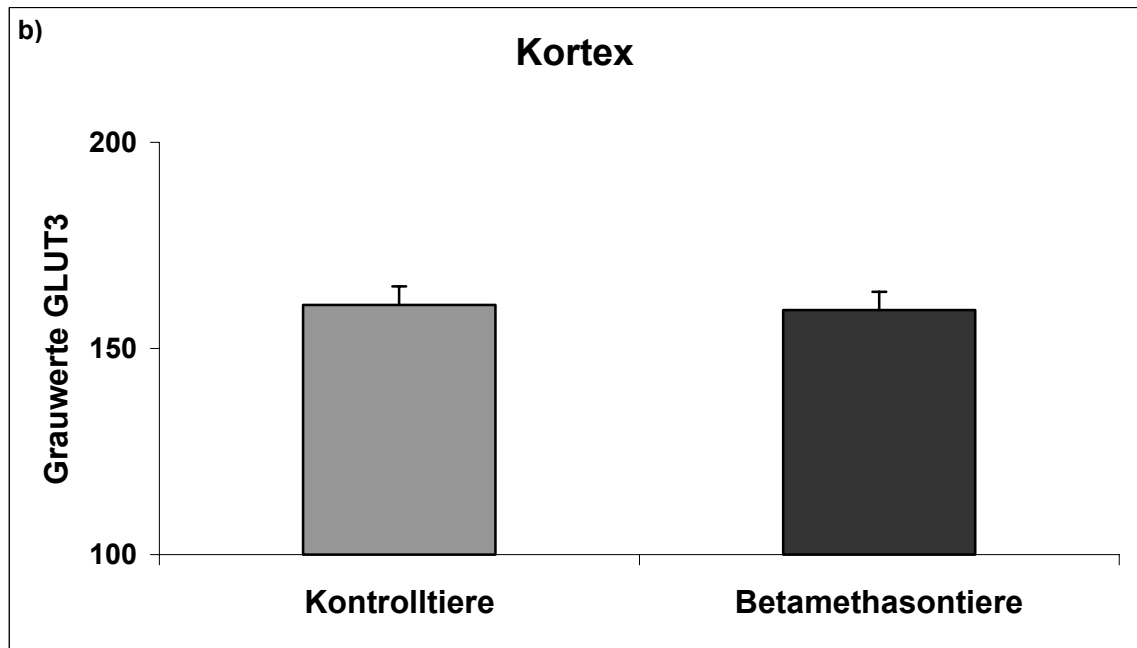


Abb. 12:
GLUT1-IR (optische Dichte) im frontalen Kortex (a), GLUT3-IR (optische Dichte) im frontalen Kortex (b) 48h nach einer maternalen NaCl- oder Betamethasonbehandlung zum Gestationszeitpunkt 0.73

5.4 Chronische Glukokortikoideffekte beim Schaffeten

Die Mutterschafe bekamen zum Gestationszeitpunkt 0.69 und 0.73 eine definierte Dosis Betamethason intramuskulär appliziert, wobei der Gesundheitszustand der Muttertiere während der Behandlung mittels Blutgasanalyse überwacht wurde (Tab. 6 – 9).

5.4.1 Physiologische Parameter der Mutterschafe zum Gestationszeitpunkt 0.69 und 0.73

Die maternalen Blutgase sowie pH–Werte unterschieden sich weder zwischen den Gruppen noch vor und nach maternaler Betamethasonapplikation.

Tab. 6:
pH–Wert und Blutgase der Mutterschafe in Abhängigkeit von einer maternalen Betamethasonbehandlung zum Zeitpunkt 0.69, $n_{\text{Kontrolle}} = 5$, $n_{\text{Betamethason}} = 8$, dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

Gestationszeitpunkt 0.69	PH	PCO ₂	PO ₂
Kontrolltiere			
vor maternaler Applikation	7,43 \pm 0,11	43,2 \pm 7,53	121,5 \pm 4,44
24 h nach maternaler Applikation	7,36 \pm 0,04	41 \pm 6,42	123,1 \pm 7,09
48 h nach maternaler Applikation	7,38 \pm 0,05	41,6 \pm 6,98	125,5 \pm 8,86
Betamethasontiere			
vor maternaler Applikation	7,38 \pm 0,04	46,3 \pm 6,46	124,5 \pm 2,41
24 h nach maternaler Applikation	7,35 \pm 0,02	49 \pm 2,31	123 \pm 3,71
48 h nach maternaler Applikation	7,39 \pm 0,06	44,3 \pm 5,86	122,4 \pm 5,41

ERGEBNISSE

Tab. 7:

pH-Wert und Blutgase der Mutterschafe in Abhängigkeit von einer maternalen Betamethasonbehandlung zum Zeitpunkt 0.73, $n_{\text{Kontrolle}} = 5$, $n_{\text{Betamethason}} = 8$, dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

Gestationszeitpunkt 0.73	pH	PCO ₂	PO ₂
Kontrolltiere			
vor maternaler Applikation	7,37 \pm 0,04	45,2 \pm 7,16	124,7 \pm 4,75
24 h nach maternaler Applikation	7,38 \pm 0,04	44 \pm 4,05	122,3 \pm 6,13
48 h nach maternaler Applikation	7,38 \pm 0,04	45,9 \pm 4,07	122,9 \pm 4,19
Betamethasontiere			
vor maternaler Applikation	7,37 \pm 0,04	48,3 \pm 6,82	124,1 \pm 6,58
24 h nach maternaler Applikation	7,35 \pm 0,01	46,2 \pm 3,16	127,3 \pm 2,87
48 h nach maternaler Applikation	7,37 \pm 0,04	46,6 \pm 2,98	123,2 \pm 4,79

5.4.2 Physiologische Parameter der Schaffeten zum Gestationszeitpunkt 0.69 und 0.73

Die fetalen Blutgase, sowie pH–Werte unterschieden sich weder zwischen den Gruppen noch vor und nach maternaler Betamethasonapplikation.

Tab. 8: :
pH–Wert und Blutgase der Schaffeten in Abhängigkeit von einer maternalen Betamethason-
behandlung zum Zeitpunkt 0.69, $n_{\text{Kontrolle}} = 5$, $n_{\text{Betamethason}} = 8$, dargestellt sind Mittelwerte \pm
SEM

Gestationszeit- punkt 0.69	PH	PCO₂	PO₂
Kontrolltiere			
vor maternaler Applikation	7,37 \pm 0,03	43,2 \pm 3,53	21,6 \pm 2,44
24 h nach maternaler Applikation	7,38 \pm 0,03	42,6 \pm 2,42	23,1 \pm 2,11
48 h nach maternaler Applikation	7,38 \pm 0,04	41,6 \pm 3,98	25,5 \pm 3,45
Betamethasontiere			
vor maternaler Applikation	7,37 \pm 0,05	46,3 \pm 4,36	24,5 \pm 2,41
24 h nach maternaler Applikation	7,35 \pm 0,03	49 \pm 3,61	23 \pm 3,71
48 h nach maternaler Applikation	7,37 \pm 0,06	44,3 \pm 4,66	22,4 \pm 2,41

ERGEBNISSE

Tab. 9: :

pH-Wert und Blutgase der Schaffeten in Abhängigkeit von einer maternalen Betamethasonbehandlung zum Zeitpunkt 0.73, $n_{\text{Kontrolle}} = 5$, $n_{\text{Betamethason}} = 8$, dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM

Gestationszeit- punkt 0.73	pH	PCO ₂	PO ₂
Kontrolltiere			
vor maternaler Applikation	7,43 \pm 0,03	45,2 \pm 2,16	24,7 \pm 3,75
24 h nach maternaler Applikation	7,36 \pm 0,04	44,3 \pm 3,05	25,3 \pm 2,13
48 h nach maternaler Applikation	7,38 \pm 0,05	41,9 \pm 4,07	26,9 \pm 4,19
Betamethasontiere			
vor maternaler Applikation	7,38 \pm 0,03	42,6 \pm 4,82	24,4 \pm 3,58
24 h nach maternaler Applikation	7,35 \pm 0,01	43,2 \pm 2,34	26,6 \pm 2,87
48 h nach maternaler Applikation	7,39 \pm 0,04	45,4 \pm 1,98	25,1 \pm 4,79

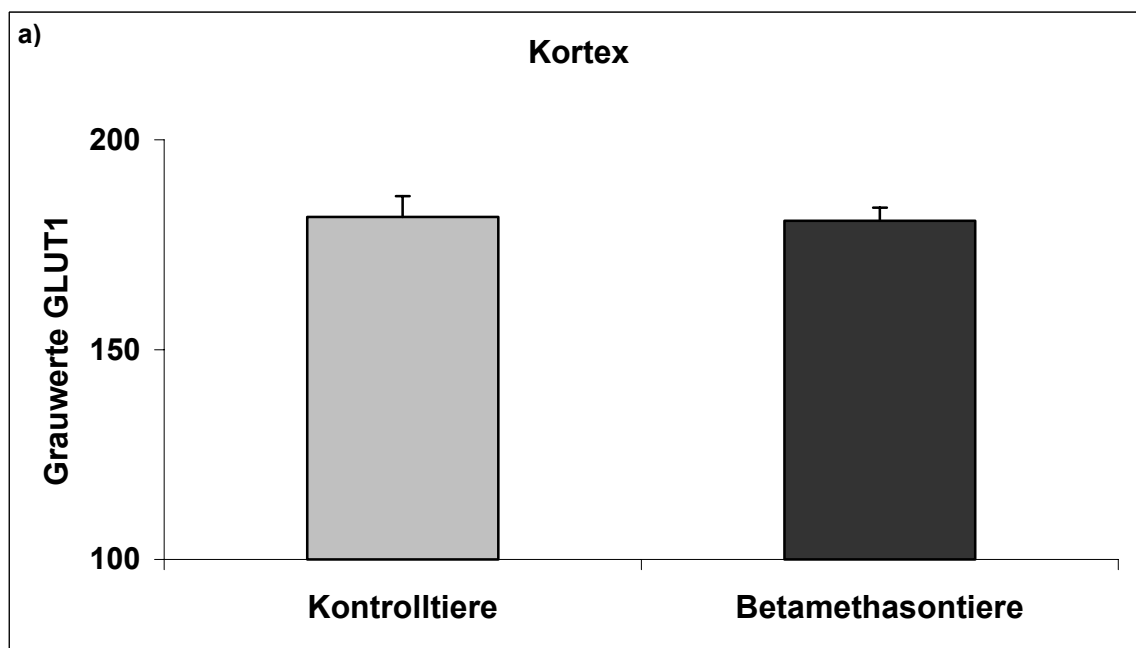
5.4.3 Betamethasoneffekte auf die Expression von GLUT1

Die Expression von GLUT1 bei wiederholter Applikation von Betamethason wurde durch Messung der optischen Dichte im frontalen Kortex, im Striatum und im Hippokampus ca. 20 Tage nach letztmaliger Verabreichung ausgewertet.

Im Kortex wurde bei der Kontrollgruppe eine optische Dichte von $181,58 \pm 5,02$ gemessen, bei den mit Betamethason behandelten Tieren von $180,71 \pm 3,13$ (Abb. 13a).

Im Striatum betrug die optische Dichte von GLUT1 der Kontrolltiere $193,90 \pm 3,75$, die der mit Betamethason behandelten Tieren $190,17 \pm 5,29$ (Abb. 13b).

Im Hippokampus wurden bei der Kontrollgruppe eine optische Dichte in der CA1 Region von $184,22 \pm 4,39$, in der CA3 Region von $181,80 \pm 3,22$ gemessen. Unter einer Betamethasonbehandlung wurde in der CA1 Region eine optische Dichte von $183,29 \pm 2,76$, in der CA3 Region eine optische Dichte von $182,34 \pm 1,87$ erfasst (Abb. 13c).



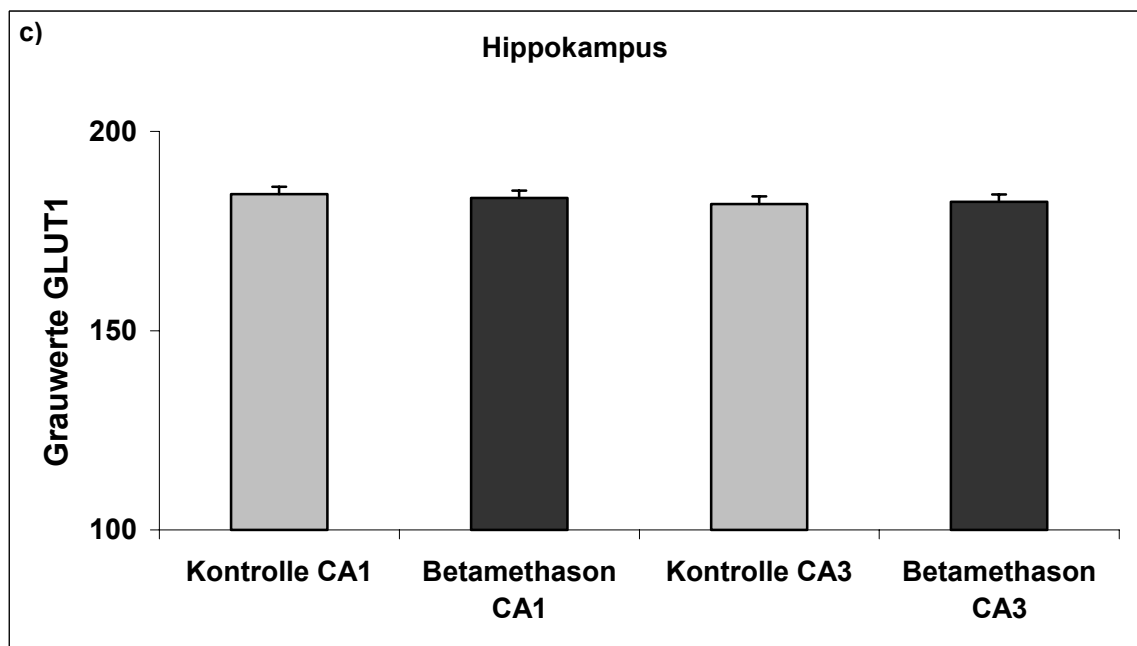
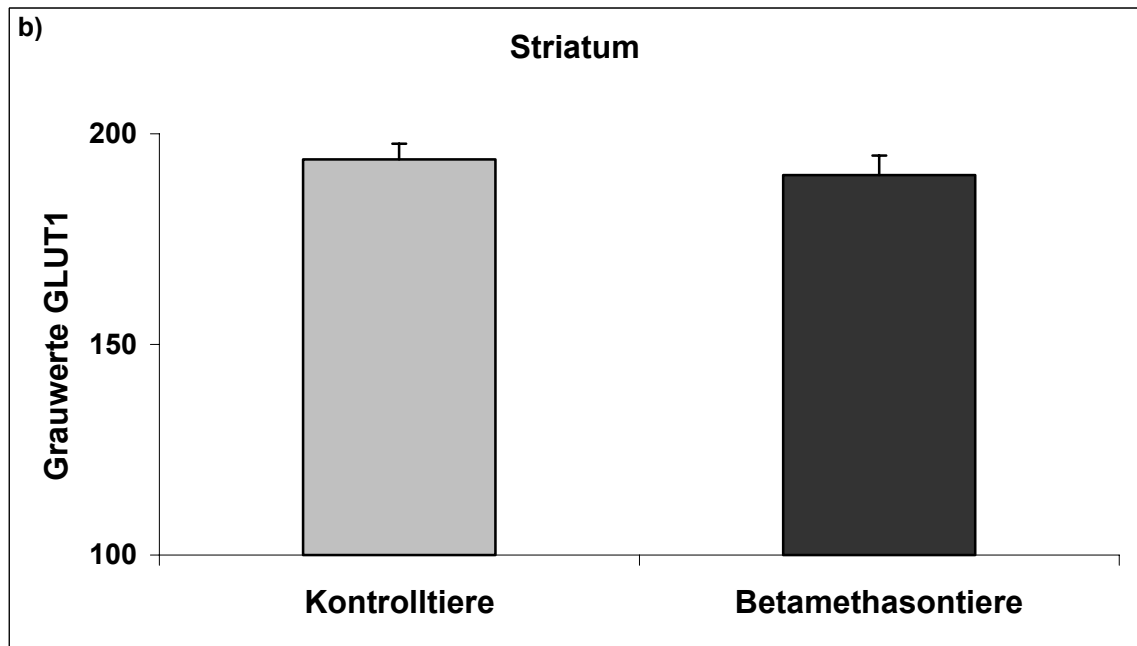


Abb. 13:
 GLUT1-IR (optische Dichte) im frontalen Kortex (a), Striatum (b) und der CA1 und CA3 Region des Hippokampus (c) 20 Tage nach einer maternalen NaCl- oder Betamethasonbehandlung zum Gestationszeitpunkt 0.87

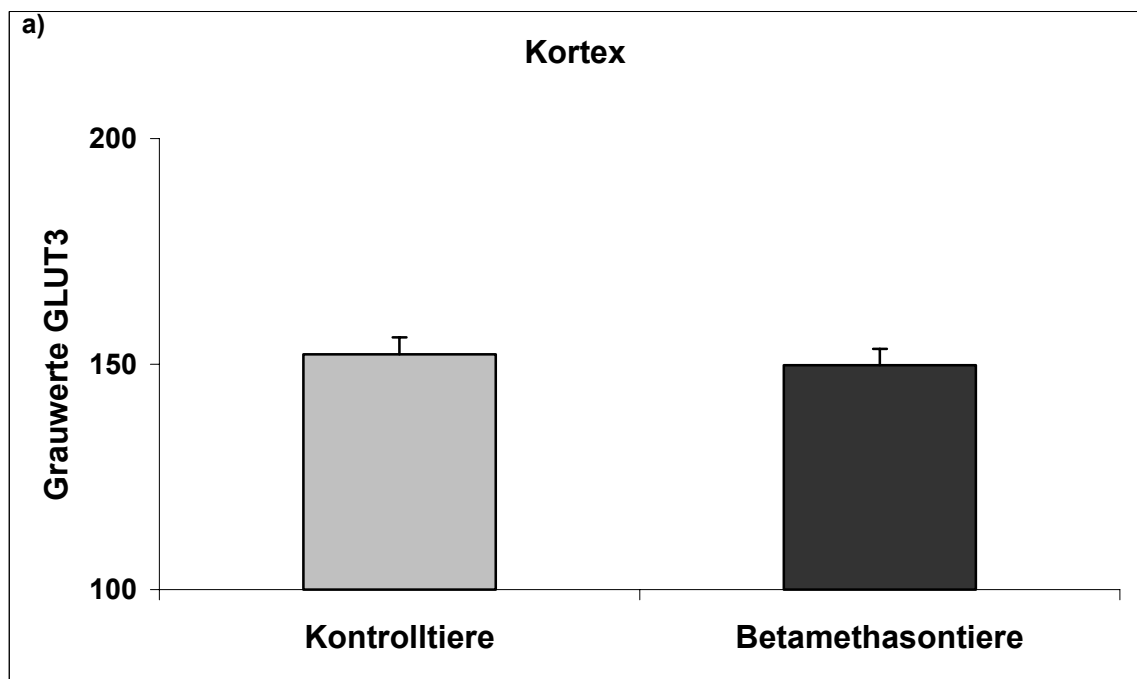
5.4.4 Betamethasoneffekte auf die Expression von GLUT3

Die Expression von GLUT3 wurde im frontalen Kortex, im Striatum und im Hippokampus ca. 20 Tage nach letztmaliger Betamethasongabe gemessen.

Im frontalen Kortex betrug die optische Dichte von GLUT3 bei den Kontrolltieren $152,16 \pm 3,74$, bei mit Betamethason behandelten Tieren $149,74 \pm 3,64$ (Abb.14a).

Bei Messungen im Striatum wurde bei den Kontrolltieren eine optische Dichte von $151,98 \pm 4,30$, bei Betamethasontieren eine optische Dichte von $151,06 \pm 4,54$ ermittelt (Abb.14b).

In der CA1 Region des Hippokampus betrug die optische Dichte von GLUT3 bei den Kontrolltieren $153,89 \pm 4,97$, bei Betamethasontieren $151,20 \pm 3,85$. In der CA3 Region wurde eine optische Dichte von $156,17 \pm 3,29$ bei den Kontrolltieren und bei mit Betamethason behandelten Tieren von $152,62 \pm 2,19$ erfasst (Abb.14c).



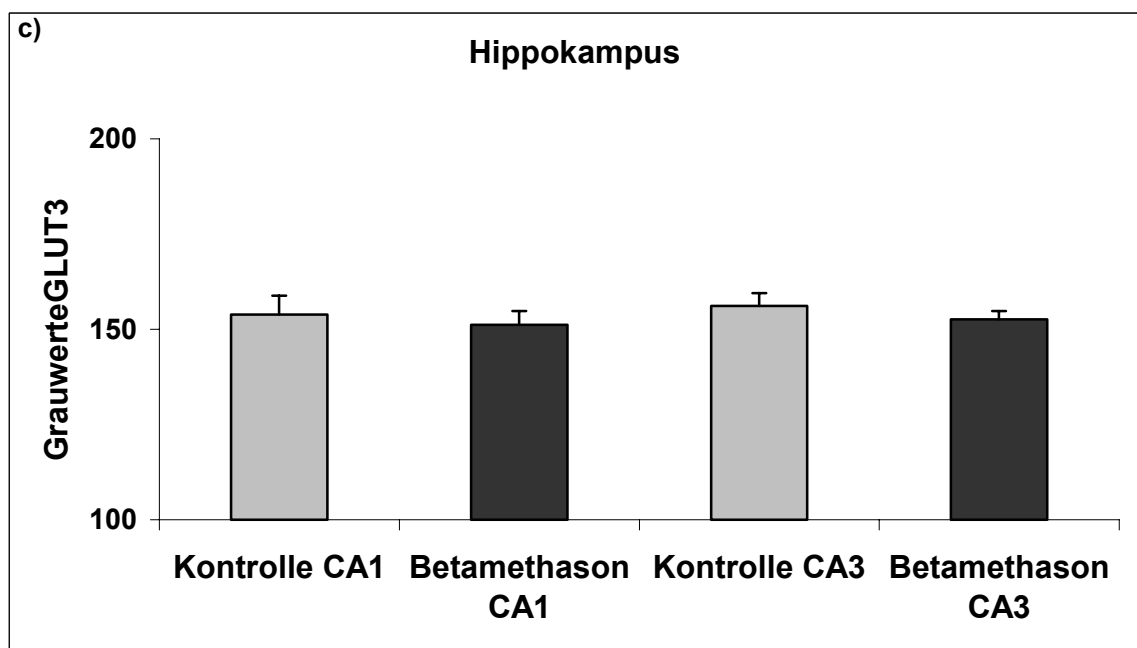
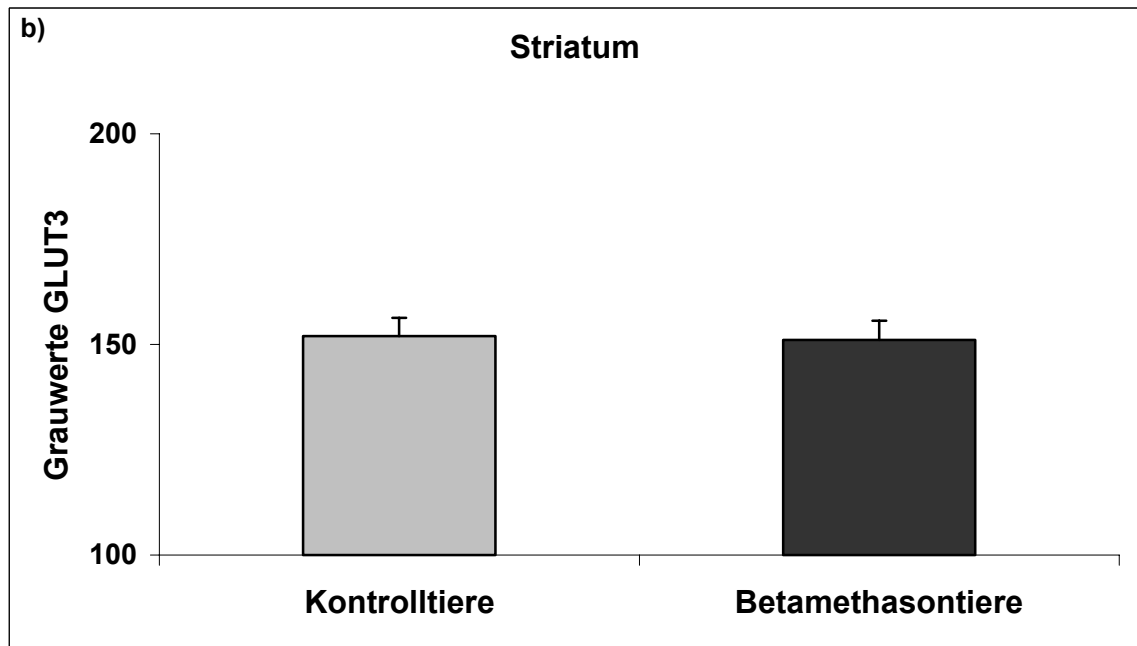


Abb. 14:
 GLUT3-IR (optische Dichte) im frontalen Kortex (a), Striatum (b) und der CA1 und CA3 Region des Hippokampus (c) 20 Tage nach einer maternalen NaCl- oder Betamethasonbehandlung zum Gestationszeitpunkt 0.87

6 Diskussion

6.1 Methodische Betrachtungen

6.1.1 Das fetale Schaf als Model für die intrauterine Entwicklung

Untersuchungen am fetalen Schaf haben sich stets als eine solide Basis für nachfolgende Studien mit Primaten zu Kernfragestellungen erwiesen. Deshalb hat sich dieses Tiermodell als Grundlage für Untersuchungen der menschlichen Fetalperiode durchgesetzt.

Die tierexperimentelle Anwendung des chronisch instrumentierten Schaffeten dient bereits seit 30 Jahren als wissenschaftliches Modell hinsichtlich physiologischer und pathophysiologischer Fragestellungen der menschlichen Fetalperiode. An diesem Tiermodell wurden bereits in den sechziger Jahren Untersuchungen zur fetalen Lungenreifung und zum RDS des Frühgeborenen durchgeführt (Strahman et al. 1964, Reynold et al. 1965, Alcorn et al 1981).

Erste Beobachtungen an Schaffeten hinsichtlich einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung zur Lungenreifung beim frühgeborenen Fetus fanden unter Mount Liggins (1969) schon vor über 30 Jahren statt. 1972 wurden die gesammelten Erkenntnisse schließlich in einer randomisierten kontrollierten Studie in Neuseeland klinisch evaluiert (Liggins & Howie 1972).

Beim Schaf sind im Allgemeinen Einlings- oder Zwillingsschwangerschaften zu erwarten. Durch eine entsprechende Größe und relative Unempfindlichkeit des Feten sind operative Eingriffe mit umfangreicher Instrumentierung möglich. Des Weiteren werden operative Maßnahmen auch vom Muttertier gut toleriert. Das Schaf als Nutztier und mittelgroßer Pflanzenfresser ist weiterhin verhältnismäßig genügsam und gewöhnt sich schnell an die Bedingungen der Käfighaltung. Durch die am Schaf leicht anzuwendende termingerechte Verpaarung kann eine gute experimentelle Planung gewährleistet werden (Müller et al. 2003).

Die intrauterine Entwicklung von Schaf und Mensch gleichen sich, wobei kleine Unterschiede, wie z.B. der etwas höhere Reifegrad des Schafgehirns zum Zeitpunkt der Geburt, bestehen (Astrom 1967, Dobbing & Sands 1979). Die Architektur des zerebralen Kortex eines 70 Tage alten Schaffeten entspricht der Kortexarchitektur eines fünf Monate alten menschlichen Feten (Astrom 1967).

Die Myelinisierung beginnt beim fetalen Schaf nach dem 90. Gestationstag, was ca. 0.6 der Gestationsdauer entspricht (McIntosh et al. 1979) und beim menschlichen Feten in der 25. Schwangerschaftswoche, vergleichbar 0.66 der Gestationsdauer, (McArdle et al. 1987, Roessmann et al. 1986).

Um die beim fetalen Schaf gewonnenen Ergebnisse zu den Glukokortikoideffekten auf Glukosetransportproteine sicher auf den Menschen übertragen zu können, wurden die Glukokortikoidwirkungen beispielhaft am frontalen Kortex des nichtmenschlichen Primaten untersucht.

6.1.2 Glukokortikoidapplikation in Klinik und Experiment

Wie bereits beschrieben (siehe Punkt 2.5) werden Glukokortikoide bei drohender Frühgeburt zwischen der 24. und 34. Schwangerschaftswoche eingesetzt.

Glukokortikoide werden im klinischen Alltag zur Lungenreifeinduktion des Kindes eingesetzt und sollen des Weiteren protektiven Charakter im Sinne eines Schutzes von intraventrikulären Blutungen haben (Crowley 2002, Pieber et al. 2003). Dazu werden der schwangeren Frau zweimal 8 – 12 mg Betamethason oder Dexamethason im Abstand von 24 Stunden intramuskulär verabreicht (Crowley 2002, Pieber et al. 2003). Diese klinische Dosis wird nicht gewichtsadaptiert angewandt.

In unserem Experiment wurde Betamethason als Standardglukokortikoid gewählt. Zu anderen Glukokortikoiden, wie Dexamethason, was gleichfalls zur Lungenreifeinduktion eingesetzt wird, besteht in der Wirkung auch aufgrund der annähernden Strukturgleichheit (siehe Abb. 1) kein Unterschied (Übersichten Löffler und Petrides. 1997).

Betamethason wurde sowohl maternal intramuskulär, als auch fetal intravenös appliziert. Durch eine intramuskuläre Injektion sollte Betamethason nahe den klinischen Gegebenheiten verabreicht werden. Betamethason wurde in unseren Untersuchungen bei intramuskulärer Applikation gewichtsadaptiert auf eine 70 Kilogramm schwere schwangere Frau verabreicht, um die verwendete Dosis zu standardisieren.

Die direkte fetale intravenöse Betamethasongabe erfolgte, um mögliche Effekte einer unterschiedlichen Plazentagängigkeit zwischen oviner und humaner Plazenta auszuschließen (Scheunert et al. 1987). Betamethason wurde wie in vorangegangenen experimentellen Studien beim fetalen Schaf in einer Dosierung dem Feten infundiert (Derks et al. 1997), die zu einer Konzentration wie sie in der humanen Nabelschnur 24 Stunden nach maternaler Betamethasonapplikation gemessen wurde, führte (Kream et al. 1983, Petersen et al. 1980). Mit dieser Dosierung traten akute, strukturelle und funktionelle zerebrale Effekte beim Schaffeten auf (Schwab et al. 2001, Antonow et al. 2002). Durch die Gabe als Infusion wurde im Gegensatz zur maternalen intramuskulären Applikation, bei der Betamethason 6 Stunden nach Verabreichung nicht mehr in der fetalen Zirkulation messbar war (Schwab et al. 2006a), gleichzeitig ein Fließgleichgewicht der fetalen Plasmakonzentration an Betamethason erreicht. Hierbei ist außerdem zu berücksichtigen, dass die pharmakologische Halbwertszeit nicht der biologischen Halbwertszeit entsprechen muss (z.B. aufgrund der längeren Bindung von Betamethason am Glukokortikoidrezeptor, so dass die biologische Halbwertszeit deutlich länger ist und etwa 48 Stunden beträgt).

6.1.3 Immunhistochemische Markierung von Glukosetransportproteinen

Immunhistochemische Färbungen werden routinemäßig seit den 80er Jahren eingesetzt und können in der Regel an formalinfixierten, paraffineingebettetem Material durchgeführt werden. Durch immunhistologische Verfahren wird es möglich, Proteine, Polysaccharide und andere Strukturen, gegen die Antikörper gebildet werden können, nachzuweisen. Das Prinzip der Immunhistologie beinhaltet die spezifische Erkennung von Antigenen durch einen Primärantikörper und die anschließende Vernetzung mit einem Sekundärantikörper. Bei vielen quantitativen biochemischen Methoden (z.B. Western Blot) gelingt eine hohe räumliche Auflösung nicht, so dass wir uns für die Immunhistochemie entschieden haben. Vorteile dieser Methode liegen in der unkomplizierten Anwendbarkeit, der hohen räumlichen Auflösung und einer

hohen Reproduzierbarkeit. Allerdings bleibt es eine Semiquantifizierung, d.h. es ist nur ein Vergleich relativer Werte möglich, nicht jedoch die Eruiierung absoluter Proteinkonzentrationen, was als Nachteil angesehen werden kann. Da die Schnitte formalinfixiert sind, sind zusätzliche Untersuchungen der Genexpression, wie z.B. durch PCR, nicht möglich, da hier natives Gewebe vorausgesetzt wird.

Das von uns angewandte immunhistologische Verfahren ist die ABC-Methode, bei der es sich um ein enzymatisches Verfahren handelt. Diese Technik nutzt die starke Affinität von Avidin oder Streptavidin für Biotin. Aus einem biotinylierten Enzym (z.B. alkalische Phosphatase oder auch Meerrettisch-Peroxidase) und Avidin werden dreidimensionale Komplexe gebildet, die über freie Bindungsstellen des Avidin an Biotingruppen des Sekundärantikörpers binden können. Pro gebundenen Primärantikörper werden so viele Enzymmoleküle am Schnitt gekoppelt. Eine Visualisierung der Immunfärbung erfolgt über eine Farbreaktion durch Diaminobenzidin (Substrat) und Wasserstoffperoxid durch exogene Peroxidase (Enzym). Dabei entsteht ein brauner, unlöslicher Niederschlag (Präzipitat), der die GLUT-Transporter (Antigen) markiert. Quasi wird die Bindung des primären Antikörpers an das GLUT-Antigen sichtbar gemacht. GLUT1 wurde bei uns im Kapillarendothel der Blut-Hirnschranke, GLUT3 in der neuronalen Membran markiert. Beide GLUT-Transporter konnten durch die ABC-Methode nachgewiesen werden.

Als primären Antikörper verwendeten wir einen polyklonalen Antikörper. Polyklonale Antikörper weisen eine gute Stabilität auf, d.h. sie reagieren unempfindlicher auf pH-Wertsschwankungen und wechselndes Ionenmilieu. Außerdem ist ihre Anwendung bei in Paraffin eingebetteten und mit Formalin fixierten Schnitten günstig, da es durch Formalinfixierung zu Konformationsänderungen einzelner Epitope eines Antigens kommen kann. Ein monoklonaler Antikörper würde beispielsweise an das spezifische Epitop des Antigens dann ohne durchgeführte Antigendemaskierung nicht mehr binden. Da Antigene jedoch mehrere Epitope aufweisen, bindet ein polyklonaler Antikörper das Antigen trotz eventueller Reaktion mit Formalin. Des Weiteren zeigen polyklonale Antikörper eine variable Affinität gegenüber Epitopen eines Antigens auf, so dass auch durch sehr gründliches Waschen im Rahmen eines Färbeprozesses nicht mit einer deutlichen Reduzierung der

Präzipitatbildungsfähigkeit und damit der Färbeintensität gerechnet werden muss (Boenisch, Handbuch Immunchemischer Färbemethoden, 2003).

Der Nachteil in der Verwendung polyklonaler Antikörper besteht allgemein in ihrem breiten Reaktionsspektrum, welches theoretisch zu Kreuzreaktionen führen kann. Um den Hintergrund möglichst gering zu halten, wurden während der Immunfärbung freie unspezifische Antigen–Bindungsstellen blockiert. Dies geschah durch Blockade der endogen Peroxidaseaktivität mit Wasserstoffperoxid, Blockade freier Aldehydgruppen durch Natriumborhydrit bzw. Inkubation mit Normalserum von der Ziege (nichtspezifisches IgG). Damit gelang es uns, die Hintergrundaktivität und damit Kreuzreaktionen gering zu halten. Weiterhin sind bei polyklonalen Antikörpern häufiger batch– bzw. chargenabhängige Qualitätsunterschiede beschrieben worden (Boenisch, Handbuch Immunchemischer Färbemethoden, 2003).

Andere Möglichkeiten der Markierung bestehen u.a. in der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, wobei die schnelle und einfache Durchführbarkeit einen Vorteil dieser Methode darstellt. Insgesamt sind Fluoreszenzfarbstoffe aber relativ instabil, oftmals nur an Gefrierschnitten durchführbar und die Ergebnisse einer gewissen Interpretation unterworfen. Weitere immunhistochemische Färbeverfahren wie die PAP–Methode (Peroxidase und Antiperoxidase) oder APAAP–Methode (Alkalische Phosphatase und Anti–Alkalische Phosphatase) erreichen die hohe Sensitivität der ABC– Methode nicht (Boenisch T, Handbuch Immunchemischer Färbemethoden, 2003).

Natürlich kann auch die ABC–Färbetechnik automatisiert werden, d.h. wir konnten eine große Menge an Gehirnschnitten in einer Serie immunhistochemisch aufarbeiten und so mögliche methodische Fehler vermeiden und ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit erreichen. Des Weiteren sind die hergestellten histologischen Präparate stabil gefärbt und auf Dauer verwendbar. Nachteilig ist die relative Empfindlichkeit der Immunhistochemie gegenüber Störvariablen zum einen durch die verwendeten Antikörper selbst, zum anderen durch mögliche Fehler beim Ansatz oder durch Kontamination der verwendeten zusätzlichen Chemikalien. Eine Vermeidung von Fehlerquellen erfolgte durch exakte Einhaltung des experimentellen Färbeprotokolls, eine standardisierte Immunfärbung, Negativkontrollen bei Immunmarkierung und Doppelblindversuch.

6.1.4 Quantifizierung der Immunmarkierung

Mittels Lichtmikroskop, Farbvideokamera und Bildverarbeitungssystem (siehe 4.6.4) konnten wird die GLUT1– und GLUT3–Immunmarkierung quantifizieren. Durch das angewandte Bildverarbeitungssystem wurde die mittlere optische Dichte als Maß für die Konzentration von GLUT1 und GLUT3 eruiert. Die Auswertung erfolgte bei 150–facher Vergrößerung, wobei die Mikroskop– und Kameraeinstellungen über die gesamte Messreihe (Weißabgleich, Blaufilter, standardisierte anatomische Regionen) konstant gehalten wurden. Die Messung der optischen Dichte mittels digitaler Bildanalyse ist eine etablierte Methode zur semiquantitativen Proteinbestimmung von Glukosetransportproteinen (Gschanes et al 2000, Windholz et al 2000, Cornford et al 1994, Vorbrodt et al. 2001, Reinprecht et al. 1999).

Die von uns verwendete Dichtemessung ist stark von der Immunfärbung abhängig, was beim experimentellen „Handling“ beachtet werden muss. Wie schon im Punkt 4.6.4 beschrieben nutzten wir zur Quantifizierung die Dichte–Messung und nicht die Messung der Fläche. Bei der Auswertung nutzten wir zunächst beide Verfahren, entschieden uns aber bei übereinstimmenden Ergebnissen aufgrund einer besseren Reproduzierbarkeit der Daten für die Dichte–Messung obwohl diese aufgrund ihrer Abhängigkeit von der Färbeintensität theoretisch technisch anfälliger ist. Um diesen Nachteil auszugleichen und die Qualität und Intensität der Immunfärbung konstant zu halten, haben wir alle immunhistochemisch zu markierenden Gehirnschnitte in einer Serie gefärbt. Die gute Reproduzierbarkeit der Daten ist ein Beweis, dass dies gelungen ist.

Die Dichtemessung erlaubt im Gegensatz zur Flächenmessung jedoch nur die Darstellung der GLUT1–Konzentration im Gefäßendothel. Die Menge an GLUT1 im Gehirn ist jedoch auch von der Zahl der Gefäße (Kapillaren) abhängig. Daher haben wir auch die ontogenetische Änderung des Quotienten der Anzahl der Blutgefäße im Bildausschnitt und der mittlerer Dichte der GLUT1–IR im Gefäßendothel gebildet.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 GLUT1 und GLUT3 während der Ontogenese im fetalen Schafgehirn

Um ein Entwicklungsprofil erstellen zu können bzw. Aussagen über die Expression von GLUT1 und GLUT3 im sich entwickelnden fetalen Schafgehirn tätigen zu können, wurde von uns die Expression von GLUT1 und GLUT3 zu verschiedenen Gestationszeiten untersucht. Die Expression von GLUT1 und GLUT3 wurde zu den Gestationszeitpunkten 0.27, 0.40, 0.53, 0.63, 0.73 und 0.87 bestimmt.

6.2.1.1 GLUT1

Eine GLUT1-IR wiesen wir in allen untersuchten Gestationsaltern nach, wobei es mit ansteigendem Gestationsalter zu einem Abfall der optischen Dichte im Endothel der Gefäße kam. Zur Bestimmung der Gesamtmenge-GLUT1 war im Bildausschnitt die Anzahl der Mikrogefäße bestimmt worden, die im untersuchten Zeitraum anstiegen. Damit konnte insgesamt im Untersuchungszeitraum trotz der Abnahme von GLUT1 pro Flächeneinheit im Endothel ein Anstieg der Gesamtmenge-GLUT1 ermittelt werden.

Die meisten Kenntnisse liegen über den GLUT1-Transporter vor. Die Kapazität des Glukosetransportes ist abhängig von der Menge an Glukosetransportproteinen. Im unreifen Rattengehirn steigt beispielsweise die Glukoseaufnahme mit dem Spiegel der 55 kDa GLUT1-Isoform von GLUT1 (Vannucci et al. 1994).

Durch die Entdeckung der intrazellulären GLUT1-Verteilung in der Blut-Hirnschranke konnten wichtige Einblicke in die Transportprozesse gewonnen werden. GLUT1 ist hauptsächlich für den Glukosetransport im Kapillarendothel der Blut-Hirnschranke und damit für die Versorgung des Gehirns mit Glukose verantwortlich (Vannucci et al. 1994, Matsumoto et al. 1995). Weiterhin vermittelt GLUT1 auch den Transport von Dehydroascorbinsäure (Rumsey et al. 1997). Diese ist als Antioxidationschutz ein wichtiger Körperbaustein. Des

Weiteren ist Dehydroascorbinsäure an verschiedenen Hydroxylierungsreaktionen als Enzym beteiligt.

Die meisten Kenntnisse über die Regulation der Glukoseaufnahme und Glukoseverwertung bzw. über Glukosetransportproteine im Gehirn stammen aus Untersuchungen von Nagetieren (Vannucci et al. 1998, Matsumoto et al. 1995, Nagamatsu et al. 1994). Dabei gibt es nur wenige Informationen zu Untersuchungen der Expression von GLUT1 und GLUT3 im sich entwickelnden fetalen Gehirn. Die postnatale Bedeutung von Glukose für das Gehirn als Hauptenergieträger und die damit verbundene Steigerung der Expression von Glukosetransportproteinen, vor allem im ersten Lebensmonat, wurde beispielsweise von Matsumoto et al. (1995) oder auch von Vannucci et al. (2003) an Ratten gezeigt. Auch am humanen Individuum fanden hierzu Untersuchungen statt (Nulart et al. 1999), in denen gezeigt werden konnte, dass GLUT1 ab der 10. Woche (entspricht 0.24 der Gestationsdauer) im humanen fetalen Gehirn nachweisbar ist. Somit schlussfolgern Nulart et al. (1999), dass GLUT1 eine wichtige Rolle in der frühen humanen Hirnentwicklung spielt.

Im hohen Maße findet die neuroendokrine Entwicklung, z.B. die fortgeschrittener Reifung von Glukokortikoidrezeptoren beim Schaf wie auch beim Primaten, schon intrauterin, also pränatal, statt (Matthews et al. 1996, Matthews 1998). Im Gegensatz dazu bringen Ratten, Mäuse oder aber auch Kaninchen ihre Jungen unreif zur Welt, so dass ein Großteil der neuroendokrinen Reifung bzw. Hirnentwicklung erst postnatal und damit extrauterin stattfindet (Sapolsky et al. 1986, Dobbing et al. 1979).

Eine GLUT1-IR konnten wir selektiv in den zerebralen Gefäßen des in Bildung befindlichen frontalen Kortex zu allen untersuchten Gestationszeitpunkten nachweisen, wobei es zu einem signifikanten Abfall der IR mit steigendem Gestationsalter kam. Unsere Daten stimmen damit mit schon getätigten Untersuchungen an Gehirnen fetaler Ratten (10. – 20. Trächtigkeitstag) überein (Matsumoto et al. 1995), in denen auch ein Abfall von GLUT1 im Verlauf der Gestation beschrieben wurde. Eine hohe GLUT1-Konzentration im Rattenembryo während der Organogenese wurde von Takao et al. (1993) und Trocino et al. (1994) beschrieben. Weitere Studien zur Ontogenese an Rattengehirnen und an Kaninchengehirnen zeigten eine hohe Expressionsrate

von GLUT1 in der Fetalperiode, die im weiteren Verlauf zum Geburtstermin hin abfällt (Sivitz et al. 1989, Asano et al. 1988). Besonders während der Organogenese ist der Embryo in hohem Maße von der anaeroben Glykolyse abhängig (Akazawa et al. 1989), so dass dies einen Erklärungsansatz für die hohe Expression von GLUT1 in der frühen Gestation darstellen könnte. Weiterhin scheint der Fetus über Monocarboxylsäure-Transporter (MCT) reichliche Mengen an β -Hydroxybutyrat zur Energiegewinnung heranzuziehen. Während die zirkulierenden Mengen an β -Hydroxybutyrat im pränatalen Rattenblut hohe Spiegel aufweisen, sinken diese postnatal stetig ab, im Gegensatz dazu steigt die postnatal zirkulierende Blutglukosemenge stark an (Vannucci et al. 2003, Lust et al. 2003). Postnatal konnte in diesem Zusammenhang von Vannucci et al. (1994) klar ein Anstieg der Expression von GLUT1 im Rattengehirn gezeigt werden, so dass dies auf eine gesteigerte postnatale Bedeutung der Glukose als Energieträger für das sich weiter entwickelnde Gehirn hinweist.

Pränatale Untersuchungen im humanen Gehirn zu Glukosetransportproteinen wurden von Nulart et al. (1999) durchgeführt. Hierbei konnte GLUT1 beispielsweise in humanen Endothelzellen, die die Blut-Hirnschranke bilden, nachgewiesen werden und auch im humanen fetalen Gehirn herrscht vor allem in der frühen Entwicklungsphase eine hohe GLUT1-IR. Interessant ist, dass die Ergebnisse am humanen fetalen Gehirn getätigten Untersuchungen in der frühen Hirnentwicklung mit denen von Ratte, Maus und Kaninchen übereinstimmen (Matsumoto et al. 1995, Harik et al. 1993, Asano et al. 1992, Hogan et al. 1991, Sivitz et al. 1989). Laut Nulart et al. (1999) spielt GLUT1 auch im humanen Gehirn eine wichtige Rolle in Bezug auf die kontinuierliche Versorgung des fetalen Gehirns mit Glukose.

Bei den von uns untersuchten Bildausschnitten wurden weiterhin die vorhandenen zerebralen Gefäße gezählt. Im Verlauf der Gestation kam es zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl von Gefäßen pro Flächeneinheit. Wir wollten eine Aussage über die Gesamtmenge von GLUT1 im fetalen Gehirn treffen, so dass wir die zerebralen Mikrogefäße mit der GLUT1-IR ins Verhältnis gesetzt haben. Der errechnete Quotient sollte das Verhältnis von zerebralen Mikrogefäßen zur untersuchten GLUT1-IR widerspiegeln. Es kam zu einem deutlichen Anstieg des Quotienten. Obwohl die GLUT1-IR pro Gefäß

im Verlaufe der Gestation abnimmt, nimmt aufgrund des Anstiegs der Gefäßzahl bzw. Gefäßdichte die Gesamtmenge GLUT1 im Entwicklungsverlauf zu.

6.2.1.2 GLUT3

Ähnlich wie bei GLUT1 kam es im Verlauf der Ontogenese bei GLUT3 zu einem signifikanten Abfall der IR, ähnlich stark wie bei GLUT1, wobei die gemessene IR für GLUT3 im Vergleich zu GLUT1 niedriger ausfiel. Letzterer Effekt ist am ehesten antikörperbedingt. Ein direkter Vergleich zwischen GLUT1 und GLUT3 ist wegen der starken antikörperbedingten Abhängigkeit der Färbeintensität, die bei der Dichtemessung bestimmt wird, nur bedingt möglich. Annehmbar wäre aber auch, wenn man frühere Untersuchungen betrachtet, dass die Expression von GLUT3 etwas verzögert im Vergleich zu GLUT1 beginnt, wie es Bondy et al. (1992) beschrieben haben. Möglicherweise setzt die Bildung der Blut-Hirnschranke in Beziehung zur Neuronenproliferation etwas eher ein. In Übereinstimmung mit unserer Studie konnte GLUT3 beim humanen Feten, im Gegensatz zu GLUT1, kaum bzw. in nur sehr geringer Menge nachgewiesen werden (Nulart et al. 1999). Ähnliche Beobachtungen machten Nagamatsu et al. (1994) an Ratten. So fand auch diese Arbeitsgruppe im pränatalen Rattengehirn (Gestationstag 15 – 18) eine geringere Expression von GLUT3 in Bezug zu GLUT1.

GLUT3 ist in der neuronalen Membran nachweisbar und ist selektiv für die neuronale Glukoseaufnahme verantwortlich (Maher et al. 1991, Bondy et al. 1992, Vannucci et al. 2003). Zum Vorhandensein von GLUT3 in der Blut-Hirnschranke gibt es widersprüchliche Angaben. Von den meisten Arbeitsgruppen, einschließlich unserer, wurde GLUT3 dagegen nicht in der Blut-Hirnschranke nachgewiesen. Dazu führten beispielsweise Bondy et al. (1992) Untersuchungen an fetalen Ratten zu verschiedenen Gestationszeitpunkten durch (0.5, 0.63, 0.68, 0.81, 0.90), GLUT3 konnte nicht in der Blut-Hirnschranke nachgewiesen werden. Allerdings wurde GLUT3 in hohem Maße in der neuronalen Membran nachgewiesen. Auch Maher et al. (1993) führten Untersuchungen an fetalen Ratten durch, wobei auch hier

GLUT3 nicht in der Blut–Hirnschranke nachgewiesen werden konnte (Gestationszeitpunkt 0.36). Maher et al. sehen die hauptsächliche Bedeutung von GLUT3 im neuronalen Glukosetransport.

Demgegenüber berichten zwei Arbeitsgruppen über das Vorhandensein von GLUT3 in der Blut–Hirnschranke (Gerhart et al. 1992, Mantych et al. 1992). Gerhart et al. (1992) wiesen GLUT3 in der Blut–Hirnschranke der adulten Ratte und des Hundes, Mantych et al. (1992) in der Blut–Hirnschranke des erwachsenen Menschen nach. Andere Studien, die sich beispielsweise mit fetalen Rattengehirnen beschäftigten, konnten GLUT3 nicht in der Blut–Hirnschranke nachweisen (Devaskar et al. 1991, Bondy et al. 1992, Maher et al. 1993, Vannucci et al. 1994). Wir konnten bei unseren Untersuchungen GLUT3 ebenfalls nicht in der Blut–Hirnschranke des fetalen Schafes nachweisen.

In Bezug auf die fetale GLUT3 Expression sehen Nagamatsu et al. (1994) bei Ratten eine Beziehung zwischen der Expression von GLUT3 und der Neuronenproliferation, ähnlich wie auch GLUT1 als ein Reifungsmarker für die Blut–Hirnschranke herangezogen werden kann (Vannucci et al. 1994). Allerdings konnten Nagamatsu et al. (1994) GLUT3 im sich entwickelnden Rattengehirn zum Gestationszeitpunkt 0.82 immunhistochemisch nicht nachweisen. Im Gegensatz dazu konnten wir GLUT3 im fetalen Schafgehirn schon zum Gestationszeitpunkt 0.27 nachweisen. Dabei ist zu beachten, dass das Rattengehirn im Vergleich zum Schafgehirn zur Geburt deutlich unreifer ist. Würde man hypothetisch davon ausgehen, dass das Rattengehirn etwa ein Viertel mehr Zeit zur Reifung hätte (dies entspräche etwa 0.57 der Gestation im Vergleich zum fetalen Schaf), dann wäre GLUT3 trotz der längeren Reife nicht nachweisbar gewesen. Möglicherweise ist die Unreife des Rattengehirns zur Geburt im Vergleich zum Schafgehirn ein Grund für das Nichterscheinen von GLUT3 bei Nagamatsu et al. (1994) zum Gestationszeitpunkt 0.82.

Im Gegensatz zu Nagamatsu et al. (1994) konnten Matsumoto (1995) GLUT3 mittels Western blot–Analyse schon zum Gestationszeitpunkt 0.45 im fetalen Rattengehirn nachweisen. Wenn man auch hier hypothetisch von einer längeren Reifezeit des Rattengehirns von etwa einem Viertel ausgehen würde (entspricht etwa 0.20 der Gestation im Vergleich zum Schaf), dann würde dies unseren Ergebnissen entsprechen, da wir GLUT3 zum Gestationszeitpunkt 0.27 nachweisen konnten. Im Verlauf fielen bei Matsumoto et al. (1995) die GLUT3–

Level bis zur Geburt hin kontinuierlich ab, um postnatal wiederum anzusteigen. Dieser Abfall der GLUT3-Level findet sich auch in unseren Untersuchungsergebnissen. Matsumoto et al. (1995) begründen den GLUT3-Level-Abfall, v. a. zwischen 0.5 und 0.6 der Gestationsdauer, mit dem direkten, GLUT3-unabhängigen Nährstofftransport. Außerdem scheinen auch andere Energieträger (z.B. Ketonkörper) eine große Rolle zu spielen (Cremer 1982, Nehlig 1997). Aus meinen Experimenten kann ich nicht auf die Ursache des GLUT3 Abfalls schließen. Brodhun et al. (2004) weisen auf ein Maximum der Zellproliferation im Gehirn zwischen 0.53 und 0.63 der Gestationsdauer beim fetalen Schaf hin, was gegen eine sehr enge Kopplung zwischen Proliferation und GLUT3-Expression spricht. Gegen Ende der Gestation, d.h. nahe der Geburt scheint der GLUT3-abhängige Glukosetransport auch aufgrund des gesteigerten Zitratzykluses wieder an Bedeutung zu gewinnen (Matsumoto et al. 1995). Dies erklärt möglicherweise den fehlenden Nachweis zum Zeitpunkt 0.82 durch Nagamatsu et al. (1994). Des Weiteren besteht auch die Möglichkeit, dass die Anwendung von Western-blot sensitiver ist. Vanucci et al. (1994) konnte GLUT3 in niedriger Konzentration im Rattengehirn am ersten postnatalen Tag, allerdings mittels Western-blot-Analyse, nachweisen. Ähnlich, wie schon bei GLUT1 beschrieben, kommt es bei der Ratte postnatal zu einem Anstieg der Expression von GLUT3, die vor allem in den älteren Hirnanteilen (Thalamus, Hippokampus) ausgeprägt ist und möglicherweise auf eine gesteigerte Glukoseutilization in diesen Arealen hinweist (Nehlig et al. 1988, Vannucci et al. 1998). Hohe GLUT3-Level zeigen sich bei der Ratte erst am 60. postnatalen Tag (Nagamatsu et al. 1994). Vanucci et al. (1994) vermuten für den GLUT3 Anstieg ursächlich das axonale und dendritische Wachstum und haben gezeigt, dass die GLUT3-Expression von der funktionellen Neuronenaktivität und der hierfür erforderlichen Glukoseutilization abhängig ist. Unterstützt wird diese Aussage dadurch, dass es unter hypoxischen Bedingungen zu einem Abfall der GLUT3-Expression kommt (Vannucci et al. 1998).

Zusammenfassend können wir feststellen, dass sowohl GLUT1 als auch GLUT3 im fetalen Kortex des Schaffeten in allen untersuchten Gestationsaltern nachweisbar sind und die Proteinexpression beider Transporter im Verlauf der Gestation absinkt.

6.2.2 Akute Glukokortikoideffekte auf GLUT1 und GLUT3 am fetalen Schaf- und Primatengehirn

Bei den Untersuchungen zu den Glukokortikoideffekten am fetalen Schaf wurde Betamethason, je nach experimenteller Gruppe, entweder maternal (siehe Punkt 6.4), als auch fetal verabreicht. Es konnte im untersuchten Gestationsalter (0.73 der Gestation, entspricht etwa der 28. SSW beim menschlichen Feten) keine signifikanten Änderung der Grauwerte von GLUT1 und GLUT3 nach Betamethasongabe in Abhängigkeit von der Applikationsart (maternale intramuskuläre Applikation versus fetale intravenöse Infusion) nachgewiesen werden.

Auch die Ergebnisse im selben Gestationsalter (0.73) beim Pavian zeigen keine Änderung der Grauwerte von GLUT1 und GLUT3. Damit ist eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die menschliche Spezies gesichert.

Somit konnten wir nachweisen, dass eine Glukokortikoidapplikation, wie sie z.B. in der Geburtshilfe angewandt wird, keinen nachweislichen Effekt auf die Expression von GLUT1 und GLUT3 im frontalen Kortex, dem Striatum und dem Hippokampus zum Gestationszeitpunkt 0.73 besitzt.

Die eruierten Ergebnisse sind dabei unabhängig von der gewählten Hirnregion und Applikationsform. Das heißt, sowohl im frontalen Kortex und dem Striatum als auch in der CA1- bzw. CA3-Region des Hippokampus fanden wir keinen Hinweise auf eine geänderte Expression von GLUT1 und GLUT3 durch Betamethason bei einmaliger Applikation zum Gestationszeitpunkt 0.73.

Betamethason wurde bei unseren Untersuchungen beim fetalen Schaf sowohl fetal als auch maternal appliziert. Eine fetale Betamethasongabe erfolgte, um eine mögliche Einflussnahme der Schafplazenta auf die Betamethasonwirkung zu vermeiden. Der fehlende Betamethasoneffekt sowohl nach mütterlicher als auch nach fetaler Gabe deutet daraufhin, dass eine eingeschränkte Plazentagängigkeit für Betamethason nicht die Ursache für den fehlenden Betamethasoneffekt ist. In der humanen Plazenta sind synthetische Glukokortikoide wie Betamethason vollständig plazentagängig, da diese kein Substrat für das Enzym 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11 β HSD) bilden, welches Kortisol inaktiviert (Seckl 2001). Dabei wurde nach fetaler Gabe eine fetale Plasmakonzentration an Betamethason erreicht (Derks et al. 1997), die

einer Konzentration in der humanen Nabelschnur 24 Stunden nach maternalen Betamethasonapplikation entsprach (Kream et al. 1983, Petersen et al. 1980). Somit ist beim fetalen Schaf kein Betamethasoneffekt im klinisch verwendeten Dosisbereich nachweisbar, der fehlende Effekt wird auch nicht durch eine schlechtere Plazentagängigkeit der ovinen Plazenta für Betamethason bestimmt. Anderson et al. (1979) beschreiben einen limitierten plazentaren Dexamethasontransport beim trächtigen Schaf, da Dexamethason verzögert in der fetalen Zirkulation nachweisbar war. Prinzipiell ist der Transport von Betamethason und Dexamethason, die strukturgleich sind, durch die Plazenta aber nicht wie der von Cortisol reguliert, da Betamethason und Dexamethason kein Substrat für die 11 β HSD sind (Seckl 2001). Möglicherweise soll der fetale Organismus durch plazentaeigene Transporter vor toxisch wirkenden aromatischen Verbindungen geschützt werden (Young et al. 2003). Dies dürfte aber nicht für Betamethason (und Dexamethason) zutreffen, da Betamethason kein natürliches Steroid ist. Ein bekannter Transporter, der in der Plazenta exprimiert wird, ist das P-Glykoprotein (Young et al. 2003). Weiterhin wurde bei in vitro- und in vivo-Untersuchungen an der humanen Plazenta ein verzögertes Erscheinen von Betamethason im fetalen Kreislauf durch einen plazentaeigene Metabolismus beschrieben (Blanford et al. 1977, Levitz et al. 1978). Auch bei Schwab et al. (2006a) wurde Betamethason verzögert in der fetalen Zirkulation beim Schaf nachgewiesen.

Etwas im Widerspruch hierzu sind Untersuchungen von Newnham et al. (1999), die in ihrer Arbeit berichten, dass vor allem eine maternale Glukokortikoidapplikation negative Effekte auf das fetale Wachstum hat. Des Weiteren scheint eine fetale intramuskuläre Injektion des Glukokortikoids (z.B. unter Sonografiekontrolle) „mildere“ Nebenwirkungen auf die intrauterine Entwicklung zu haben (Moss et al. 2003). Newnham (1999, 2001) beschreiben in diesem Zusammenhang eine geringere Beeinflussung des fetalen Wachstums und keine negativen Effekte auf den Blutdruck bei gleicher Wirksamkeit in Bezug auf die Förderung der Lungenreifung. Auch Moss et al. (2003) weisen auf die gleiche Wirksamkeit zur Förderung der Lungenreifung bei mehrfacher maternalen und fetaler Injektion des Glukokortikoids hin, wobei bei fetaler Injektion negative Effekte, wie zum Beispiel ein vermindertes Hirngewicht bzw. neurologisch-kognitive Einschränkungen, deutlich seltener sind. Moss et

al. (2003) weisen aber auch daraufhin, dass eine einmalige Betamethasondosis wohl keine Langzeiteffekte hat. Schwab et al. (2006a) untersuchten unter anderem die Pharmakokinetik zweier unterschiedlicher klinisch relevanter Betamethasondosen ($110 \mu\text{g kg}^{-1} \text{KG}^{-1}$ und $170 \mu\text{g kg}^{-1} \text{KG}^{-1}$, entsprechen 8 mg bzw. 12 mg für eine 70 kg schwere schwangere Frau) an trächtigen Schafen, die Betamethason intramuskulär erhalten hatten. Sie konnten zeigen, dass die erzielten Plasmaspiegel beim Mutterschaf und beim Schaffeten proportional zur applizierten Dosis waren. Betamethason erschien im fetalen Plasma dabei verzögert und war für acht Stunden nachweisbar. Die klinischen Effekte bei der Verwendung von Betamethason in einer Dosis von $110 \mu\text{g kg}^{-1} \text{KG}^{-1}$ und $170 \mu\text{g kg}^{-1} \text{KG}^{-1}$ scheinen dabei gleich zu sein, da ja auch beide Dosen in der Geburtshilfe Verwendung finden (Günter et al. 2004). Weiterhin beschreiben Schwab et al. (2006a), dass der fetale Blutdruck im genannten Dosisbereich unabhängig gleich reagiert.

Aufgrund der von uns getätigten experimentellen Untersuchungen können wir sagen, dass Betamethason den Glukosetransport über die Blut–Hirnschranke (GLUT1) und durch die neuronale Membran (GLUT3) nicht hemmt. Damit ist dies im sich entwickelnden Gehirn nicht der potentielle Mechanismus für katabole Glukokortikoideffekte. Wir vermögen eine veränderte Glukoseutilization trotz einer konstanten Expression von GLUT1 und GLUT3 nicht auszuschließen, da Betamethason auch direkte Effekte auf die Glukoseutilization haben kann, beispielsweise eine Verminderung der Glukoseutilization, nachgewiesen am sich in Entwicklung befindlichen Rattengehirn (Tuor et al. 1997) und im adulten Rattengehirn (Doyle et al. 1994). Glukokortikoide wirken katabol bzw. insulinantagonistisch über eine gesteigerte Glukoneogenese und Glykogensynthese (Übersicht in Karow/Lang-Roth 2003). Weiterhin bewirken Glukokortikoide beim fetalen Schaf eine Hemmung der Atmungskettenenzyme, nachgewiesen bei Schwab et al. (2006b).

Unsere Ergebnisse stehen außerdem im Widerspruch zu den von Horner et al. (1990) an kultivierten Neuronen des Hippokampus und an Gliazellen der Ratte durchgeführten Untersuchungen, in welchen es zu einer konzentrations– und zeitabhängigen Verminderung der Glukoseaufnahme in die Zelle nach Gabe von Dexamethason kam. Die Untersuchungen von Horner et al. (1990) fanden allerdings als in vitro–Experiment statt und es wurden keine

Glukosetransportproteine untersucht. Potentiell einflussnehmende Mechanismen (z.B. die Blut–Hirnschranke) wurden damit ausgeschaltet und somit die Physiologie nicht Eins zu Eins dargestellt. Mit unseren in vivo–Untersuchungen an verschiedenen Spezies sind wir jedoch den physiologischen Vorgängen im Körper näher.

Hypothetisch könnte man davon ausgehen, dass GLUT1 in der Blut–Hirnschranke bzw. GLUT3 in der neuronalen Membran gegenüber einer mehrfachen Glukokortikoidapplikation unempfindlich in ihrer Expression reagieren, um eine basale und damit konstante Glukoseverwertung zu gewährleisten. Ein anderer Ansatzpunkt stellt der K_M Wert für GLUT1 und GLUT3 dar. Dieser ist bei beiden Proteinen sehr niedrig im Vergleich zu anderen Glukosetransportproteinen, z.B. bei GLUT1 = 18 – 21 mmol/l, bei GLUT2 = 42 mmol/l ist (Übersichten Löffler und Petrides 1997). Auch dadurch wird ein konstanter Glukosestrom zum Gehirn gewährleistet. Von vor allem pränataler Bedeutung scheinen auch die schon im Punkt 6.2 angesprochenen MCT zu sein (Gerhart et al. 1997), denn durch diese gelangen weitere Energieträger aus denen Glukose entstehen kann, durch die Blut–Hirnschranke in das fetale Gehirn.

In unseren Untersuchungen am fetalen Schafgehirn wurde, um einen engen Bezug zum Menschen herzustellen, zusätzlich das nichtmenschliche Primatengehirn mit selbiger Fragestellung integriert. GLUT1 in der Blut–Hirnschranke und neuronales GLUT3 zeigen dabei gleiches Verteilungsmuster im fetalen Gehirn von Schaf und Pavian zum Gestationszeitpunkt 0.73. Das fetale Gehirn des Schafes und das fetale Primatengehirn zeigen weiterhin einen ähnlichen zeitlichen Verlauf der Hirnentwicklung, auch wenn das fetale Schafgehirn zum Geburtstermin etwas reifer ist (Dobbing et al. 1979, McIntosh et al. 1979). Das analoge Verteilungsmuster von GLUT1 und GLUT3 bestätigt, dass das fetale Schafgehirn ein gutes Modell für Untersuchungen zur fetalen Hirnentwicklung ist. Dies ist auch in Übereinstimmung mit den ähnlichen Effekten von Betamethason auf MAP und Synaptophysin bei fetalen Schafen und nichtmenschlichen Primaten (Antonow-Schlorke et al. 2006, Colberg et al. 2004, Antonow-Schlorke et al. 2002).

Trächtige Pavianweibchen bekamen eine definierte Betamethasondosis intramuskulär appliziert. Diese gewichtsadaptierte Dosis entsprach 12 mg

Betamethason pro Tag für eine 70 Kilogramm schwere schwangere Frau und war damit 50% höher als die in den vorliegenden Untersuchungen beim Schaf verwendete Betamethasondosis. Für die klinische Bedeutung unserer Untersuchungen war dieser Unterschied jedoch nicht von Relevanz, da klinisch sowohl 8 mg als auch 12 mg verwendet werden (Günter et al. 2004, Ballard et al. 1995). Weiterhin findet unter klinischen Bedingungen keine gewichtsadaptierte Dosierung der verwendeten Glukokortikoide statt, was weitere interindividuelle Schwankungen in der für den Feten verfügbaren Dosis beim Menschen implizieren kann. Trotz all dieser Dosisschwankungen konnten klinisch keine Unterschiede in den Effekten auf die Lungenreifung (Günter et al. 2004, Ballard et al. 1995) oder andere katabole Effekte gefunden werden (Mulder et al. 2004, Noel et al. 2004, Doyle et al. 2000). Auch experimentell haben die beiden Betamethasondosen ähnliche Effekte, so auf den fetalen Blutdruck (Schwab et al. 2006a) und auch auf die Atmungskettenenzyme (Schwab et al. 2006b) beim fetalen Schaf.

Die Verwendung von nichtmenschlichen Primaten bei unseren Untersuchungen kann auch in Bezug auf die Plazentagängigkeit einen entscheidenden Vorteil darstellen, da die Pavianplazenta und die humane Plazenta eine ähnliche Durchgängigkeit für Cortisol besitzen (Gitau et al. 1998). Schafplazenta und Primatenplazenta weisen in Bau und Struktur zwar Unterschiede auf, hinsichtlich der Betamethasoneffekte auf die GLUT-Konzentration konnten wir jedoch keinen Unterschied feststellen, auch wenn wir die Plazentagängigkeit für Betamethason nicht gemessen haben (Scheunert et al. 1987).

Zusammenfassend wird die Expression beider Glukosetransportproteine weder im fetalen Schaf- noch im Primatengehirn im Gegensatz zu den Effekten auf wesentliche Strukturproteine wie MAP oder Synaptophysin (Antonow-Schlorke et al. 2006, Colberg et al. 2004, Antonow-Schlorke et al. 2002) akut gehemmt.

Die Hemmung des Glukosetransportes ist damit kein Mechanismus für die katabolen Glukokortikoideffekte, die im sich entwickelnden Gehirn der Ratte (Tuor et al. 1997) und bei neuronalen Zellkulturen (Horner et al. 1990) nachgewiesen wurden. Sie ist auch nicht dafür verantwortlich, dass es über einen möglichen Glukosemangel zu einer verminderten Synthese von Strukturproteinen wie MAP oder Synaptophysin kommt .

6.2.3 Chronische Glukokortikoideffekte auf GLUT1 und GLUT3 am fetalen Schafgehirn

Von großer klinischer Bedeutung ist, ob eine antenatale Glukokortikoidbehandlung einen längerfristigen Effekt auf die Hirnentwicklung hat. Wir konnten im fetalen Schafgehirn, ähnlich zu den fehlenden akuten Effekten, keinen chronischen Effekt von Betamethason selbst nach zweimaliger maternaler Applikation zum Zeitpunkt 0.69 und 0.73 auf die Expression von GLUT1 und GLUT3 21 Tage nach der letzten Betamethasongabe eruieren.

Trotzdem scheint es eine Vielzahl von Effekten auf andere Parameter zu geben, wobei dann allerdings eine Hemmung der Glukoseaufnahme in die Zelle und damit eine mangelnde Energiebereitstellung nicht die Ursache ist.

In Bezug auf chronische Glukokortikoidwirkungen auf das fetale Gehirn konnten Uno et al. (1990, 1994) an trächtigen Rhesusaffen zeigen, dass die maternale intramuskuläre Dexamethasonapplikation dosisabhängig und mit steigender Applikationshäufigkeit beim Feten zu einer Neuronendegeneration in hippokampalen Strukturen führte. Allerdings bekamen die Rhesusaffen Dexamethason ($0,5$ bis $10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KG}^{-1}$ bei einmaliger Gabe, $0,125$ bis $2,5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KG}^{-1}$ bei mehrfacher Gabe) in einer deutlich höheren Dosierung und zu einem etwas späteren Gestationszeitpunkt (0.8 der Gestationsdauer bei einmaliger Gabe, 0.8 und 0.81 der Gestationsdauer bei multipler Gabe) im Vergleich zu unseren Untersuchungen verabreicht. Die multiple Dexamethasongabe erfolgte bei Uno et al. (1990) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen und im Abstand von 12 Stunden. Einen Zusammenhang zwischen intrauterinen Effekten und Mehrfachapplikation in Bezug auf eine verzögerte neuronale Entwicklung und ein vermindertes Geburtsgewicht sehen z.B. auch French et al. (1999), Newnham (1999), Newnham (2001). Auch Brabham et al. (2000) und Emgard et al. (2007) berichten über Defizite der kognitiven Funktion (z.B. räumliches Lernen), sowie über eine gestörte Stressantwort bei erwachsenen Ratten, deren Mütter pränatal wiederholt Dexamethason erhalten hatten. Bei Brabham et al. (2000) wurden $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1} \text{ KG}^{-1}$ Dexamethason als Trinklösung trächtigen Ratten angeboten (Applikationsbeginn 0.65 der Gestation, tägliche Gabe). Diese Dosis musste aufgrund von gehäuft auftretenden Aborten um $5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ reduziert

werden. Emgard et al. (2007) applizierten $100 \mu\text{g kg}^{-1} \text{KG}^{-1}$ Dexamethason trächtigen Ratten intraperitoneal (Applikationsbeginn 0.36 der Gestation, tägliche Gabe). Analog zu den weiter oben beschriebenen Effekten am Rhesusaffen kam es als Ausdruck der Störung der Morphogenese und der Hirnentwicklung auch beim Schaffeten zu einer Reduktion des Geburtsgewicht um bis zu 27 Prozent nach drei oder viermaliger ultraschallgestützter intramuskulärer antenataler Betamethasonbehandlung mit $0,5 \text{ mg kg}^{-1} \text{fetales KG}^{-1}$ (Ikegame et al. 1997). Von dieser Reduktion des Geburtsgewichts sind alle Organe einschließlich des Gehirns betroffen (Newnham et al. 1999). Eine postnatale Verringerung des fetalen Gehirngewichts um bis zu 20 Prozent beobachtete Huang et al. (1999) bei Schaffeten, die dreimal im wöchentlichen Abstand eine ultraschallgestützte intramuskuläre Betamethasoninjektion ($0,5 \text{ mg kg}^{-1} \text{fetales KG}^{-1}$) erhielten. Gegenüber unbehandelten Schaffeten wies Moss et al. (2005) bis zu einem Alter von 3,5 Lebensjahren ein vermindertes Hirngewicht um 13 – 18 Prozent bei maternaler Applikation bzw. 7 – 8 Prozent bei fetaler Applikation nach. Moss et al. (2005) konnten eine signifikante Dosis–Wirkungsbeziehung in Bezug auf die Abnahme des Hirngewichts herleiten. Dazu wurde Betamethason einmalig zum Gestationszeitpunkt 0.69 oder wiederholten zu den Gestationszeitpunkten 0.69, 0.73, 0.79 und 0.83 sowohl maternal ($0,5 \text{ mg kg}^{-1} \text{KG}^{-1}$ intramuskuläre Applikation) als auch fetal ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ geschätztes KG^{-1} fetal–intramuskulär) appliziert. Eine Dosis–Wirkungsbeziehung in Bezug auf die Abnahme des Hirngewichts konnten Moss et al (2005) sowohl bei maternaler als auch bei fetaler Applikation aufzeigen. Interessanterweise waren die Effekte (Abnahme des Hirngewichts) bei maternaler Applikation stärker ausgeprägt. Die von uns verwendete Dosis (zweimal $110 \mu\text{g kg}^{-1} \text{KG}^{-1}$) war niedriger, als die von Ikegami et al. (1997), Huang et al. (1999) und Moss et al. (2005) applizierten Dosen. Bei unseren Untersuchungen erhielten die Mutterschafe zum Gestationszeitpunkt 0.69 und 0.73 zweimal $110 \mu\text{g kg}^{-1} \text{KG}^{-1}$ Betamethason im Abstand von 24 Stunden intramuskulär injiziert. Wir konnten nach wiederholter Applikation von Betamethason keinen Effekt auf GLUT1 und GLUT3 nachweisen, wie schon bei einmaliger Applikation kein Effekt auf GLUT1 und GLUT3 nachweisbar war (siehe Punkt 6.2.2). Die etwas geringere Dosis spielt sicher keine Rolle, auch wenn wir den Wachstumseffekt nicht untersucht haben.

Beim Menschen gibt es widersprüchliche Ergebnisse zu den chronischen Effekten einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die Entwicklung der kognitiven Funktion und des Verhaltens. So konnten bei Kindern, deren Mütter pränatal eine einmalige Glukokortikoidapplikation erhielten, scheinbar keine wesentlichen Effekte auf neurologische und kognitive Funktionen eruiert werden (Liggins et al. 1972, Crowley 1995, Smolders et al. 1990). Auch Dalziel et al. (2005) konnten bei Untersuchungen an Erwachsenen, deren Mütter eine einmalige pränatale Betamethasondosis zur Lungenreifeförderung erhalten hatten, keine negativen Effekte auf neurologische und kognitive Funktionen feststellen. Andererseits ist in Zusammenhang mit einer multiplen Glukokortikoidgabe während der Schwangerschaft auch über eine verzögerte mentale und psychomotorische Entwicklung in der Kindheit und Jugendzeit diskutiert worden (Esplin et al. 2000, Sinervo et al. 1999). Esplin et al. 2000 beschrieben nach multipler Glukokortikoidgabe eine verminderte psychomotorische Entwicklung bei Neugeborenen. Wiederholte Glukokortikoidapplikationen an schwangere Frauen führten zu einer fetalen Gewichtsreduktion und zu einer Reduktion des Kopfumfanges bei den Kindern der Frauen (French et al. 1999, Walfisch et al. 2001). French et al. (1999) beschrieben außerdem ein gehäuftes Auftreten eines hyperaktiven Verhaltens bei Kindern, deren Mütter während der Schwangerschaft multiple Glukokortikoidapplikationen erhalten hatten. French et al. (2004) konnten zeigen, dass sowohl bei drei Jahre alten Kindern als auch bei sechs Jahre alten Kindern, deren Mütter während der Schwangerschaft wiederholt Glukokortikoide zur Lungenreifeinduktion erhalten hatten (drei oder mehrfache Glukokortikoidapplikation), die Rate an aggressivem und schädigendem sowie unaufmerksamem und hyperkinetischem Verhalten zunahm. Nicht betroffen von einer multiplen Glukokortikoidapplikation waren intellektuelle Fähigkeiten der untersuchten Kinder. Untersuchungen an sechs Jahre alten Kindern erbrachten einen Zusammenhang zwischen wiederholter pränataler Glukokortikoidgabe und gestörten Funktionen der visuellen Verarbeitung, speziell des visuellen Gedächtnisses (MacArthur et al. 1982). Eine Zunahme von gestörter Emotionalität, Vermeidungsverhalten, Ungeselligkeit und allgemeine Probleme im Umweltverhalten beschrieben Trautman et al. (1995) bei Kindern, deren Mütter pränatal wiederholt Glukokortikoide erhalten hatten.

Wir gehen davon aus, dass die beschriebenen Glukokortikoideffekte auf die zerebrale Morphogenese und Hirnfunktion in der klinisch üblichen Glukokortikoiddosis nicht durch eine gestörte Glukoseaufnahme verursacht werden. Möglich wäre jedoch ein direkter Effekt auf Transmitter oder aber katabole Stoffwechseleffekte.

Wir haben sicherlich keine zu niedrige Dosis gewählt, da selbst durch ein Viertel der gewählten Dosis Effekte an Atmungskettenenzymen nachweisbar waren (Schwab et al. 2006b). Bezüglich der Wirkung von Glukokortikoiden ist weiterhin zu erwähnen, dass die mehrfache Applikation von Dexamethason bei trächtigen Ratten in der späten Gestation bei den Nachkommen zu einem deutlichen Abfall des Serotoninumsatzes im Neokortex, Hippokampus und Hypothalamus führte (Muneoka et al. 1997). Hierzu hatten trächtige Ratten einmal täglich $50 \mu\text{g kg}^{-1} \text{KG}^{-1}$ Dexamethason zu den Gestationszeitpunkten 0.77, 0.81 und 0.90 subcutan erhalten. Die von Muneoka et al. (1997) angewandte Dexamethasondosis war damit ca. um die Hälfte geringer als die von uns verwendete Betamethasondosis, so dass bei unseren Tieren potentiell auch von einem solchen Effekt ausgegangen werden muss. Untersuchungen zu den Transmittern waren aber nicht Bestandteil dieser Arbeit.

Insgesamt muss berücksichtigt werden, dass bei all diesen Studien die Betamethasoneffekte mehrere Monate bis Jahre nach der Applikation untersucht wurden, während wir diese nach ca. drei Wochen untersucht haben. Dass die katabolen Glukokortikoideffekte und auch die Effekte auf die Synthese von Strukturproteinen wie MAP oder Synaptophysin nur transient sind, erklärt möglicherweise das Fehlen chronischer Effekte auf GLUT. Die beschriebenen Effekte auf das Hirngewicht (deutliche Dosis–Wirkungsbeziehung) scheinen also anderen Mechanismen zu folgen. Möglicherweise kommt es zu einer Hemmung der neuronalen und glialen Proliferation zugunsten einer verstärkten Differenzierung.

7 Schlussfolgerungen

GLUT1 und GLUT3 waren schon im frühen Gestationsalter im sich in Bildung befindlichen frontalen Kortex nachweisbar. Im untersuchten Zeitraum kommt es zu einem Abfall der GLUT1- und GLUT3-IR und zu einem deutlichen Anstieg der zerebral-kapillären Gefäßendothelversorgung. Wir vermuten, dass die in der frühen Gestation stattfindende Organogenese ein Grund für die hohe Expression von vor allem GLUT1 darstellt. Weiterhin gehen wir davon aus, dass es trotz des Abfalls der GLUT1-IR pro Gefäß im Verlauf der Gestation durch Anstieg der Gefäßzahl bzw. Gefäßdichte insgesamt zu einem Anstieg der Gesamtmenge an GLUT1 kommt.

Eine einmalige und eine wiederholte Betamethasongabe, sowie die Applikationsart und Applikationszeit hatten bei unseren Untersuchungen keine Effekte auf die Expression von GLUT1 und GLUT3. Auch im Vergleich Schaf versus nichtmenschlicher Primat ergaben sich keine Unterschiede, so dass die hier beim fetalen Schaf gewonnen Ergebnisse zum Einfluss der Dosis und des Applikationsweges von Betamethason auf die GLUT1- und GLUT3-Expression auf den Menschen übertragbar sind.

Wir arbeiteten mit zwei Tiermodellen (Schafmodell, Primatenmodell). Das jeweils gewählte Tiermodell hat sich bei unseren Untersuchungen als zuverlässig für unsere Fragestellungen erwiesen. Insbesondere die gut planbare termingerechte Verpaarung, eine entsprechende Größe und Unempfindlichkeit des Feten und die gute Toleranz von operativen Maßnahmen beim Schaf sind hierbei hervorzuheben. Durch Untersuchungen an Pavianen wurde die Übertragbarkeit auf den Menschen gesichert.

Die ABC-Methode zur immunhistochemischen Bearbeitung unserer Hirnschnitte erwies sich als ein sicheres und gut automatisierbares Verfahren zur Behandlung unserer Fragestellungen. Beide untersuchten Glukosetransportproteine konnten mit der ABC-Methode an den typischen Lokalisationen, GLUT1 in der Blut-Hirnschranke, GLUT3 in der neuronalen Membran, nachgewiesen werden. Die in der Literatur beschriebene hohe Sensitivität der ABC-Methode können wir

SCHLUSSFOLGERUNGEN

bestätigen. GLUT1 kann als ein Reifungsmarker der Blut–Hirnschranke, GLUT3 als ein Reifungsmarker für die Neuronenproliferation angenommen werden.

Die digitale Bildanalyse stellt ein Verfahren beträchtlicher Präzision bei einfacher Handhabung und hoher Reproduzierbarkeit dar.

Die Hemmung der Glukoseaufnahme in die Neuronen ist kein Mechanismus für die katabolen Glukokortikoideffekte, die im sich entwickelnden Gehirn der Ratte und in vitro nachgewiesen wurden. Eine Hemmung der Glukoseaufnahme in die Neuronen ist auch nicht dafür verantwortlich, dass es über einen möglichen Glukosemangel zu einer verminderten Synthese von Strukturproteinen wie MAP oder Synaptophysin kommt.

Wir gehen davon aus, dass die beschriebenen Langzeitglukokortikoideffekte auf die zerebrale Morphogenese und Hirnfunktion in der klinisch üblichen Glukokortikoiddosis ebenfalls nicht durch eine gestörte Glukoseaufnahme verursacht werden. Berücksichtigt man, dass fast 10 Prozent aller Schwangeren pränatal mit Betamethason behandelt werden, sind weitere Untersuchungen zur Klärung der Mechanismen, die zu einer akuten Verminderung der Synthese von Strukturproteinen und den chronischen Effekten auf die zerebrale Morphogenese und Hirnfunktion führen, erforderlich. Insbesondere scheint hier die wiederholte Gabe nachteilig zu sein, weshalb sie in den aktuellen Therapieempfehlungen als kontraindiziert gesehen wird. Möglicherweise bedarf es einer sehr hohen und lang wirksamen Glukokortikoiddosis, um die Expression von GLUT1 in der Blut–Hirnschranke bzw. GLUT3 in der neuronalen Membran signifikant zu beeinflussen. Da wir aber mit den klinisch verwendeten Dosierungen gearbeitet haben, sind solche Untersuchungen aus klinischer Sicht nicht dringend erforderlich.

8 Literaturverzeichnis

Abbasi S, Hirsch D, Davis J, Tolosa J, Stouffer N, Debbs R, Gerdes JS. 2000. Effects of single versus multiple courses of antenatal corticosteroids on maternal and neonatal outcome. *Am J Obstet Gynecol* 182(5): 1243-1249.

Abbott J. 2002. Astrocyte–endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 200: 629-638.

Aghajanian GK, Bloom FE. 1967. The formation of synaptic junctions in developing brain: a quantitative electron microscopic study. *Brain Res* 6: 716-727.

Ahima RS, Harlan RE. 1990. Cloning of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience* 39: 579-604.

Ahima RS, Krozowski Z, Harlan RE. 1991. Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids. *J Comp Neurol* 313(3): 522-538.

Akazawa M, Akazawa S, Hashimoto M, Akashi M, Yamasaki H, Tahara D, Yamamoto H, Yamaguchi Y, Nakanishi T, Nagataki S. 1989. Effects of brief exposure to insulin-induced hypoglycemic serum during organogenesis. *Diabetes* 38: 1573-1578.

Alcorn D G, Adamson T M, Maloney J E, Robinson P M. 1981. A morphologic and morphometric analysis of fetal lung development in the sheep. *Anatomical Report* 201: 655.

Anderson DF, Stock MK, Rankin JH. 1979. Placental transfer of dexamethasone in near-term sheep. *J Dev Physiol* 1: 431-436.

Anderson HF, Erhart B. 1999. Repeated corticosteroid doses have no effect on birthweight. *Am J Obstet Gynecol* 178: 183.

Anderson MS, Flowers-Ziegler J, Das UG, Hay WW JR, Devaskar SU. 2001. Glucose transporter protein responses to selective hyperglycemia or hyperinsulinemia in fetal sheep. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 281: R1545-R1552.

Antonow-Schlorke I, Müller T, Schubert H, Wicher C, Schwab M. 2002. Betamethasone related acute alterations of brain microtubule associated proteins in the fetal sheep brain are independent of baseline plasma cortisol level. *Cesk Gynecol* 67 (Suppl. 3): 3.

Antonow-Schlorke I, Schwab M, Li C, Nathanielsz PW. 2003. Glucocorticoid exposure at the dose used clinically alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. *J Physiol* 547(Pt 1): 117-123.

Anwar MA, Schwab M, Poston L, Nathanielsz PW. 1999. Betamethasone-mediated vascular dysfunction and changes in hematological profile in the ovine Fetus. *Am J Physiol* 276(4 Pt 2): H1137-143.

Arnold SE & Trojanowski JQ. 1996. Human fetal hippocampal development: II. The neuronal cytoskeleton. *J Comp Neurol* 367(2): 293-307.

Asano T, Shibasaki Y, Kasuga M, Kanazawa Y, Takaku F, Akanuma Y, Oka Y. 1988. Cloning of a rabbit brain glucose transporter cDNA and alteration of glucose transporter mRNA during tissue development. *Biochem Biophys Res Commun* 154:1204-1211.

Astrom KE. 1967. On the early development of the isocortex in fetal sheep. *Prog Brain Res* 26: 1-59.

Ballard PL & Ballard RA. 1995. Scientific basis and therapeutic regimens for use of antenatal glucocorticoids. *Am J Obstet Gynecol* 173(1): 254-262.

Banks BA, Cnaan A, Morgan MA, Parer JT, Merrill JD, Ballard D PL, Ballard Ra. 1999. Multiple courses of antenatal corticosteroids and outcome of premature neonates. *Am J Obstet Gynecol* 181: 709-717.

Barker DJ. 1998. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* 95(2): 115-128.

Beato M, Herrlich P, Schütz G. 1995. Steroid hormone receptors: many factors in search of a plot. *Cell* 83: 851-857.

Benders MJ, Dorrepaal CA, van de Bor M, van Bel F. 1995. Acute effects of indomethacin on cerebral hemodynamics and oxygenation. *Biol Neonate* 68(2): 91-99.

Benesova O, Pavlik A. 1989. Perinatal treatment with glucocorticoids and the risk of maldevelopment of the brain. *Neuropharmacology* 28: 89-97.

Benninghof, A – Makroskopische Anatomie. 1994. Embryologie und Histologie des Menschen, Band 2, 15. Auflage. Hrsg. D. Drenkhahn, W. Zenker. Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore.

Bershadsky AD & Vasiliev JM. Cytoskeleton. 1989. Plenum Press, New York.

Blajchman MA, Senyi AF, Hirsh J, Surya Y, Buchanan M, Mustard JF. 1979. Shortening of the bleeding time in rabbits by hydrocortisone caused by inhibition of prostacyclin generation by the vessel wall. *J Clin Invest* 63(5): 1026-1035.

Blanford AT, Murphy BE. 1977. In vitro metabolism of prednisolone, dexamethasone, betamethasone and cortisol by the human placenta. *Am Obstet gynecol* 127: 264-267.

Blondel B, Kogan MD, Alexander GR, Dattani N, Kramer MS, Macfarlane A, Wen SW. 2002. The impact of the increasing number of multiple births on the Rates of preterm birth and low birthweight: an international study. *Am J Public Health* 92(8): 1323-1330.

Boenisch TH. 2003. Handbuch immunchemischer Färbemethoden, 3. Auflage, DakoCytomation Corp. Carpinteria, CA, USA, 5-14.

Boenisch TH. 2003. Handbuch immunchemischer Färbemethoden, 3. Auflage, DakoCytomation Corp. Carpinteria, CA, USA, 34-43.

Bohn MC, Friedrich VL. 1982. Recovery of myelination in rat optic nerve after developmental retardation by cortisol. *J Neurosci* 2(9): 1292-1298.

Bohn MC, Goldstein M, Black IB. 1982. Expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in rat sympathetic ganglia and extra-adrenal chromaffin tissue. *Dev Biol* 89(2): 299-308.

Bolz S, Farrell CL, Dietz K, Wolburg H. 1996. Subcellular distribution of glucose transporter (GLUT1) during development of the blood-brain barrier in rats. *Cell Tissue Res* 284: 355-365.

Bondy CA, Lee W, Zhou J. 1992. Ontogeny and cellular distribution of brain Glukose transporter gene expression. *Mol Cell Neurosci* 3: 305-314.

Brabham T, Phelka A, Zimmer C, da Nash A, Lo'pez JF, Va'zquez DM. 2000. Effects of prenatal dexamethasone on spatial learning and response to stress is influenced by maternal factors. *Am J Physiol* 279: R1899–R1909.

Brodhun M, Coksaygen T, Antonow-Schlorke I, Schubert H, Müller T, Patt S, Nathanielsz PW, Schwab M. 2003. Developmental profile of DNA-fragmentation in the fetal sheep brain – effects of glucocorticoids. *J Neurosci*

Brodhun M, Müller T, Coksaygen T, Antonow-Schlorke I, Schubert H, Patt S, Nathanielsz PW, Schwab M. 2004. Neurogenesis and programmed cell death during development of the fetal sheep brain. *J Soc Gynecol Invest* 11 (Supl.): 532.

Bywood PT, Johnson SM. 2000. Dendrite loss is a characteristic early indicator of toxin-induced neurodegeneration in rat midbrain slices. *Exp Neurol* 161: 306-316.

Cabanas F, Pellicer A, Garcia Alix A, Quero J, Stiris TA. 1997. Effect of dexamethasone therapy on cerebral and ocular blood flow velocity in premature infants studied by colour Doppler flow imaging. *Eur J Pediatr* 156(1): 41-46.

Campbell DM, Hall MH, Barker DJP, Cross J, Shiell AW, al. e. 1996. Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later. *British J Obstet Gyn* 103: 273-280.

Caruthers A. 1990. Facilitated diffusion of Glukose. *Physiol Rev* 70: 1135-1176.

Celsi G, Kistner A, Aizman R, Eklof AC, Ceccatelli S, de Santiago A, Jacobson SH. 1998. Prenatal dexamethasone causes oligonephronia, sodium retention, and higher blood pressure in the offspring. *Pediatr Res* 44(3): 317-22.

Challis JRG, Lye SJ, Gibb W, Whittle W, Patel F, Alfaidy N. 2001. Understanding preterm labor. *Ann NY Acad Sci* 943: 225-234.

Chapotot F, Gronfier C, Jouny C, Muzet A, Brandenberger G. 1998. Cortisol secretion is related to electroencephalographic alternans in human subjects during daytime wakefulness. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 4263-4268.

Chipkin SR, van Bueren A, Bercl E, Garrison CR, McCall AL. 1998. Effects of dexamethasone in vivo and in vitro on hexose transport in brain microvasculature. *Neurochem Res* 23: 645-652.

Chugani HT, Phelps ME. 1986. Maturation changes in cerebral function in infants determined by ¹⁸F-DG positron emission tomography. *Science* 231: 840-843.

Chugani HT, Phelps ME, Mazziotta JC. 1987. Positron emission tomography study of human brain functional development. *Ann Neurol* 22: 487-492.

Ciaranello RD, Jacobowitz D, Axelrod J. 1973. Effect of dexamethasone on phenylethanolamine N-methyltransferase in chromaffin tissue of the neonatal rat. *J Neurochem* 20(3): 799-805.

Cintra A, Zoli M, Rose L. 1994. Mapping and computer assisted morphometry and microdensitometry of glucocorticoids receptor immunoreactive neurons and glial cells in the rat central nervous system. *Neuroscience* 62: 843-897.

Clewlow F, Dawes GS, Johnston BM, Walker DW. Changes in breathing, electrocortical and muscle activity in unanaesthetized fetal lambs with age. *J Physiol* 341: 463-476.

Cocks JA, Balazs R, Johnson AL, Eayrs JT. 1970. Effects of thyroid hormone on the biochemical maturation of rat brain: conversion of Glukose-carbon into amino acid. *J Neurochem* 17: 1275-1285.

Cohlen BJ, Stigter RH, Derks JB, Mulder EJ, Visser GH. 1996. Absence of significant hemodynamic changes in the Fetus following maternal betamethasone administration. *Ultrasound Obstet Gynecol* 8(4): 252-255.

Colberg C, Antonow-Schlorke I, Müller T, Schubert H, Witte OW, Schwab M. 2004. Recovery of glucocorticoid-related loss of synaptic density in the fetal sheep brain at 0.75 of gestation. *Nerosci Let* 364 (2): 130-134.

Conford EM, Hyman S, Swartz BE. 1994. The human brain GLUT1 glucose transporter: ultrastructural localization to the blood-brain barrier endothelia. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:106-112.

Creasy RK. 1991. Preventing preterm birth. *N Engl J Med* 235: 727-729.

Cremer JE. 1982. Substrate utilization and brain development. *J Cereb Blood Flow Metab* 2: 394-407.

Crowley P. 1995. Antenatal corticosteroid therapy: a meta-analysis of the randomized trials, 1972-1994. *Am J Obstet Gynecol* 173: 322-335.

Crowley P. 2002. Prophylactic corticosteroids for preterm birth (Chochrane Review). The Chochrane Library, Issue 4.

Crowley P. 2003. Antenatal corticosteroids – current thinking. *Br J Obstet gynaecol* 110: (Suppl 20) 77-78.

Crutchley DJ, Ryan US, Ryan JW. 1985. Glucocorticoid modulation of prostacyclin production in cultured bovine pulmonary endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 233(3): 650-655.

Dalziel SR, Lim VK, Lambert A, McCarthy D, Parag V, Rodgers A, Harding JE. 2005. Antenatal exposure to betamethasone: psychological functioning and health related quality of life 31 years after inclusion in randomised controlled trial. *BMJ* 331(7518): 645-646.

De Caterina R & Weksler BB. Modulation of arachidonic acid metabolism in human endothelial cells by glucocorticoids. *Thromb Haemost* 55(3): 369-74, 1986

De Kloet ER, Rosenfeld P, Van Eekelen JA, Sutanto W, Levine S. 1988. Stress, glucocorticoids and development. *Prog Brain Res* 73. 101-120.

DeKosky ST, Nonneman AJ, Scheff SW. 1982. Morphologic and behavioral effects of perinatal glucocorticoid administration. *Physiol Behav* 29: 895-900.

Demarini S, Dollberg S, Hoath SB, Ho M, Donovan EF (1999). 1999. Effects of antenatal corticosteroids on blood pressure in very low birth weight infants during the first 24 hours of life. *J Perinatol* 19(6): 419-425.

Derks JB, Giussani DA, Jenkins SL, Wentworth RA, Visser GH, Padbury JF, Nathanielsz PW. 1997. A comparative study of cardiovascular, endocrine and behavioural effects of betamethasone and dexamethasone administration to fetal sheep. *J Physiol (Lond)*, 499: 217-226.

Derks JB, Mulder EJ, Visser GH. 1995. The effects of maternal betamethasone administration on the Fetus. *Br J Obstet Gynaecol* 102(1): 40-46.

Devaskar SD, Zahm S, Holtzclaw L, Chundu K, Wadzinski BE. 1991. Developmental regulation of the distribution of rat-brain insulin-insensitive (Glut1) glucose transporter. *Endocrinology* 129: 1530-1540.

Deza L, Eidelberg E. 1967. Development of corticalelectrical activity in the rat. *Exp Neurol* 17: 425-438.

Dick APK, Harik SI, Klip A, Walker DM. 1984. Identification and characterization of the Glucose transporter of the blood-brain barrier by cytochalasin B binding and immunological reactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 7233-7237.

Dobbing J, Sands J. 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*: 3: 79-83.

Dodic M, May CN, Wintour EM, Coghlan JP. 1998. An early prenatal exposure to excess glucocorticoid leads to hypertensive offspring in sheep. *Clin Sci* 94 (2): 149-155.

Dole N, Savitz DA, Hertz-Picciotto I, Siega-Riz AM, McMahon MJ, Buekens P. 2003. Maternal stress and preterm birth. *Am J Epidemiol* 157(1): 14-24.

Doyle , Guillaume Gentil C, Rohner Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. 1994. Effects of corticosterone administration on local cerebral Glucose utilization of rats. *Brain Res* 645(1-2): 225-230.

Doyle LW, Ford GW, Rickards AL, Kelly EA, Noni MD, Callanan C, Olnisky A. 2000. Antenatal corticosteroids and outcome at 14 years of age in children with birth weights less than 1501 grams. *Pediatrics* 106: 127.

Dunlop SA, Archer MA, Quniliven JA, Beazley LD, Newnham JP. 1997. Repeated prenatal corticosteroids delay myelination in the ovine central nervous system. *J Mat Fet Med* 6: 309-313.

Duval D, Durant S, Homo Delarche F. 1983. Non-genomic effects of steroids. Interactions of steroid molecules with membrane structures and functions. *Biochim Biophys Acta* 737: 409-442.

Dwyer DS, Vannucci SJ, Simpson IA. 2002. Expression, regulation, and functional role of Glukose transporters (GLUTs) in brain. *Int Rev Neurobiol* 51: 159-188.

Edwards A, Baker LS, Wallace EM. 2002. Changes in fetoplacental vessel flow velocity waveforms following maternal administration of betamethasone. *Ultrasound Obstet Gynecol* 20(3): 240-244.

Elimian A, Verma U, Canterino J, Shah J, Visintainer P, Tejani N. 1999. Effectiveness of antenatal steroids in obstetric subgroups. *Obstet Gynecol* 93(2): 174-179.

Emgard M, Paradisi M, Pirondi S, Fernadez M, Giardino L, Calza L. 2007. Prenatal glucocorticoid exposure affects learning and vulnerability of cholinergic neurons. *Neurobiol Aging* 28(1):112-121.

Endo Y, Nishimura J, Kimura F. 1994. Adrenalectomy increases local zerebral blood flow in the rat hippocampus. *Pflugers Arch* 426(3-4): 183-188.

Endo Y, Nishimura JI, Kobayashi S, Kimura F. 1997. Long-term glucocorticoid treatments decrease local zerebral blood flow in the rat hippocampus, in association with histological damage. *Neuroscience* 79(3): 745-752.

Esplin MS, Fausett MB, Smith S, Oshiro BT, Porter TF, Branch DW, Varner MW. 2000. Multiple courses of antenatal steroids are associated with a delay in long-term psychomotor development in children with birth weights < 1,500 grams. *Am J Obstet Gynecol* 182: 24.

Esters DM, Pass J, Egan JFX. 2000. Serial betamethasone use in a clinic practice: Does it effect fetal growth? *Am J Obstet Gynecol* 182: 57.

Fattoretti P, Bertoni-Freddari C, Di Stefano G, Casoli T, Gracciotti N, Solazzi M, Pompei P. 2001. Quantitative immunohistochemistry of GLUT3 expression in the rat hippocampus during aging. *J Histochem Cytochem* 49: 671-672.

Fields HM, Rinaman L, Devaskar SU. 1999. Distribution of Glukose transporter isoform-3 and hexokinase I in the postnatal murine brain. *Brain Res* 846: 260-264, 1999

French NP, Hagan R, Evans SF, Godfrey M, Newnham JP. 1999. Repeated antenatal corticosteroids: Size at birth and subsequent development. *Am J. Obstet. Gynecol* 180: 114-121.

French NP, Hagan R, Evans SF, Mullan A, Newnham JP. 2004. Repeated antenatal corticosteroids: Effects on cerebral palsy and childhood behavior. *Am J. Obstet. Gynecol* 190: 588-595.

Gardner DS, Jackson AA, Langley Evans SC. 1997. Maintenance of maternal diet-induced hypertension in the rat is dependent on glucocorticoids. *Hypertension* 30(6): 1525-1530.

Gerhart DZ, Emerson BE, Zhdankina OY, Leino RL, Drewes LR. 1997. Expression of Monocarboxylate transporter MCT 1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 273: E207-E213.

Gerhart DZ, LeVasseur RJ, Broderius MA, Drewes LR. 1989. Glucose transport localization in brain using light and electron immunocytochemistry. *J Neurosci Res* 22: 464-472.

Gerhart DZ, Leino RL, Borson ND, Taylor WE, Gronlund KM, McCall AL, Drewes LR. 1995. Localization of glucose transporter GLUT3 in brain: comparison of rodent and dog using species-specific carboxyl-terminal antisera. *Neuroscience* 66: 237-246.

Gerhart DZ, Broderius MA, Borson ND, Drewes LR. 1992. Neurons and microvessels express the brain glucose transporter protein GLUT3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 733-737.

Gitau R, Cameron A, Fisk NM & Glover V. 1998. Fetal exposure to maternal cortisol. *Lancet* 352, 707-708.

Greger R, Windhorst U. 1996. *Comprehensive Human Physiology*, Vol. 1. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York.

Gschane A., R. Boado, W. Sametz, M. Windisch: 2000. The drug Cerebrolysin and its peptide fraction E021 increase the abundance of the blood – brain barrier Glut1 Glucose transporter in brains of young and old rats. *The Histochemical Journal* 32: 71-77.

Gumbinas M, Oda M, Huttenlocher P. 1973. The effects of corticosteroids on myelination of the developing rat brain. *Biol Neonate* 22: 355-366.

Günter HH, Oehler K, Scharf A, Maul H, Sohn C. 2004. Lungenreifeinduktion mit Glukokortikoiden – einmalige oder wiederholte Applikation? *Geburtsh Frauenheilk* 64: 781-792.

Hanu R, McKenna M, O'Neill A, Resneck WG, Bloch RJ. 2000. Monocarboxylic acid transporters, MCT1 and MCT2, in cortical vitro and in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C921-C930.

Harik SI, Hall AK, Richey P, Andersson L, Lundahl P, Perry G. 1993. Ontogeny of the erythroid/HepG2-type glucose transporter (GLUT-1) in the rat nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 72 : 41-49.

Hassan AH, von Rosenstiel P, Patchev VK, Holsboer F, Almeida OF. 1996. Exacerbation of apoptosis in the dentata gyrus of the aged rat by dexamethason an the protective role of corticosterone. *Exp Neurol* 140: 43-52.

Hawkins RA, Mans AM, Davis DW. 1986. Regional ketone body utilization by rat brain in starvation and diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 250: E169-E178.

Hoet JJ & Hanson MA. 1999. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J Physiol Lond* 514(Pt 3): 617-627.

Hogan A, Heyner S, Charron MJ, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Thorens B, Schultz GA. 1991. Glucose transporter gene expression in early mouse embryos. *Development* 113: 363-372.

Horner HC, Packan DR, Sapolsky RM. 1990. Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia. *Neuroendocrinology* 52: 57-64.

Howard E, Benjamins JA. 1975. DNA, ganglioside and sulfatid in brains of rats given corticosterone in infancy, with an estimate of cell loss during development. *Brain Res* 92: 73-87.

Howard E. 1973. Increased reactivity and impaired adaptability in operant behavior of adult mice givven corticosterone in infancy. *J Comp Physiol Psychol* 85: 211-220.

Huang WL, MBBS, Beazley LD, Quinlivan JA, MRACOG, Evans SF, Newnham JP, FRACOG, Dunlop SA. 1999. Effect of corticosteroids on brain growth in fetal sheep. *Obstet Gynecol* 94: 213-218.

Huang WL, Harper CG, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA.. 2001. Repeated prenatal corticosteroids administration delays myelination of the corpus callosum in fetal sheep. *Int J Devl Neuroscience* 19: 415-425.

Ikegami M, Jobe AH, Newnham J, Polk DH, Willet KE, Sly P. 1997. Repetitive prenatal gloccorticoids improve lunge function and decrease growth in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 178-184.

Jobe AH, Polk D, Ikegami M, Newnham J, Sly P, Kohen R, Kelly R. 1993. Lung responses to ultrasound-guided fetal treatment with corticosteroids in preterm lambs. *J Appl Physiol* 75(5): 2009-2105.

Jobe AH, Wada N, Berry LM, Ikegami M, Ervin MG. 1998. Single and repetitive maternal glucocorticoid exposures reduce fetal growth in sheep. *Am J Obstet Gynecol* 178(5): 880-885.

Jobe AH, Newnham J, Willet K, Sly P, Igkeami M. 1998. Fetal versus maternal and gestational age effects of repetitive antenatal glucocorticoids. *Pediatrics* 102: 1116-1125.

Joels M, de Kloet ER. 1992. Controll of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *Trends Neurosci* 15: 25-30.

Joels M, de Kloet ER. 1994. Mineralcorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol* 43: 1-36.

Johnson JW, Mitzner W, Beck JC, London WT, Sly DL, Lee Pa, Khouzami VA, Cavalieri RL. 1981. Long-term effects of betamethasone on fetal development. *Am J Obstet Gynecol* 141: 1053-1064.

Johnson GV & Jope RS. 1992. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in neuronal growth, plasticity and degeneration. *J Neurosci Res* 33: 505-512.

Jones SA, Adamson SL, Bishai I, Lees J, Engelberts D, Coceani F. 1993. Eicosanoids in third ventricular cerebrospinal fluid of fetal and newborn sheep. *Am J Physiol* 264(1 Pt 2): R135-142.

Jones WB, Thron WJ. 1980. Continued Fractions: Analytic Theory and Applications, Addison Wesley.

Kari MA, Hallman M, Eronen M, Teramo K, Virtanen M, Koivisto M, Ikonen RS. 1994. Prenatal dexamethasone treatment in conjunction with rescue therapy of human surfactant: a randomized placebo-controlled multicenter study. *Pediatrics* 93(5): 730-736.

Karow/Lang-Roth. Ausgabe 2003. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Herausgeber Thomas Karow: 449.

Karst H, Wadmann WJ, Joles M. 1993. Long-term control by corticosteroids of the inward rectifier in rat CA1 pyramidal neurons, in vitro. *Brain Res* 612: 172-179.

Keelan JA, Coleman M, Mitchel MD. 1997. The molecular mechanisms of term and preterm labor: recent progress and clinical implications. *Clin Obstet Gynecol* 40: 460-478.

Kennedy B, Elayan H, Ziegler MG. 1993. Glucocorticoid hypertension and nonadrenal phenylethanolamine N-methyltransferase. *Hypertension* 21(4): 415-419.

Kennedy C, Sakurada O, Shinohara M, Jehle J, Miyaoka M. 1982. Local cerebral glucose utilization in the newborn macaque monkey. *Ann Neurol* 12: 333-340.

Kerr DS, Campbell LW, Thibault O, Landfield PW. 1992. Hippocampal glucocorticoid receptor activation enhances voltage-dependent Ca^{2+} conductances: relevance to brain aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8527-8531.

Khan JY, Rajakumar RA, McKnight RA, Devaskar UP, Devaskar SU. 1999. Development regulation of genes mediating murine brain Glucose uptake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 276: R892-R900.

Klinke R, Silbernagel S. 1996. *Lehrbuch der Physiologie*, 2. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 721-726.

Kream J., Mulay S., Fukushima DK., Solomon S: 1983. Determination of plasma dexamethasone in the mother and the newborn after administration of the hormone in a clinical trial. *J Clin Endocrinol Metabol* , 56: 127-133.

Landgraf R, Mitro A, Hess J. 1978. Regional net uptake of ^{14}C glucose by rat brain under the influence of corticosterone. *Endocrinol. Exp.* 72: 119-128.

Langley Evans SC. 1997. Intrauterine programming of hypertension by glucocorticoids. *Life Sci* 60(15): 1213-1221.

Law CM, Shield AW. 1996. Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature. *J Hypertens* 14: 935-941.

Leffler CW & Busija DW. 1987. Arachidonic acid metabolites and perinatal cerebral hemodynamics. *Semin Perinatol* 11(1): 31-42.

Leino RL, Gerhardt DZ, Drewes LR. 1999. Monocarboxylate transporter (MCT1) abundance in brains of suckling and adult rats: a quantitative electron microscopic immunogold study. *Dev Brain Res* 113: 47-54.

Leviton A, Kuban KC, Pagano M, Allred EN, Van Marter L. 1993. Antenatal corticosteroids appear to reduce the risk of postnatal germinal matrix hemorrhage in intubated low birth weight newborns. *Pediatrics* 91(6): 1083-1088.

Levitt NS, Lindsay RS, Holmes MC, Seckl JR. 1996. Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. *Neuroendocrinology* 64(6): 412-418.

Levitz M, Jansen V, Dancis J. 1978. The transfer and metabolism of corticosteroids in the perfused human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 132: 363-366.

Liggins GC & Howie RN. 1972. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 50 (4): 515-525.

Liggins GC. 1969. Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J Endocrinol* 45(4): 515-23.

Löffler G, Petrides PE. 1997. *Biochemie und Pathobiochemie*, 5. Auflage. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 973-975.

Löhle M, Müller T, Wichert C, Roedel M, Schubert H, Witte OW, Nathanielsz PW, Schwab M. 2005. Bethamethason effects on fetal sheep cerebral blood flow are not dependent on maturation of cerebrovascular system and pituitary-adrenal axis. *J Physiol* 564(2): 575-588.

Lupien SJ, McEwen BS. 1997. The acute effects of corticosteroids on cognition : integration of animal and human model studies. *Brain Res Rev* 24: 1-27

Lust WD, Pundik S, Zechel J, Zhou Y, Buczek M, Seiman WR. 2003. Changing metabolic and energy profiles in fetal, neonatal and adult brain. *Metab Brain Dis.* 18(3): 195-206.

MacArthur BA, Howie RN, Dezoete JA, Elkins J. 1982. School progress and cognitive development of 6 years old children whose mothers were treated antenatally with betamethasone. *Pediatrics* 70: 99-105.

MacDorman MF, Minino AM, Strobino DM, Guyer B. 2002. Annual summary of vital statistics--2001. *Pediatrics* 110(6): 1037-1052.

Meadow WL, Bell A, Sunstein CR. 2003. Statistics, not Memories: What was the standard of care for administering antenatal steroids to women in preterm labor between 1985 and 2000? *Obstet. Gynecol.* 102, 356-362.

Maher F, Davies-Hill TM, Simpson IA. 1996. Substrate specificity and kinetic parameters of GLUT3 in rat cerebellar granula neurons. *Biochem J* 315: 827-831.

Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. 1993. Glukose transport isoforms in brain: absence of GLUT3 from the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 342-345.

Maher F, Davies-Hill TM, Lysko PG, Henneberry RC, Simpson IA. 1991. Expression of two Glukose transporters, GLUT1 and GLUT3, in cultured cerebellar neurons: evidence for neuron-specific expression of GLUT3. *Mol Cell Neurosci* 2: 351-360.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P. 1995. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93: 531-541.

Mann H, Whitney D. 1947. On a test of whether one of two variables is stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics* 18: 50-60.

Mantych GJ, James DE, Chung HD, Devaskar SD. 1992. Cellular localization and characterization of GLUT3 glucose transporter isoform in human brain. *Endocrinology* 131: 1270-1278.

Matsumoto K, Akazawa S, Ishibashi M, Trocino RA, Matsuo H, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Nagamatsu S, Nagataki S. 1995. Abundant expression of GLUT1 and GLUT3 in rat embryo during the early organogenesis period. *Biochem Biophys Res Commun* 209(1): 95-102.

Matus A. 1990. Microtubule-associated proteins and the determination of neuronal form. *J Physiol Paris* 84: 134-137.

Matthews SG, Challis JRG. 1996. Regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in fetal sheep. *Trends Endocrinol Metab* 7: 239-246.

Matthews SG. 1998. Dynamic changes in glucocorticoid and mineralcorticoid receptor mRNA in the developing guinea pig brain. *Dev Brain Res* 107: 123-132.

McArdle CB, Richardson CJ, Nicholas DA, Mirfakhraee M, Hayden CK, Amparo EG. 1987. Developmental features of the neonatal brain: MR imaging. Part I. Gray-white matter differentiation and myelination. *Radiology* 162: 223-229.

McEwen BS, Albeck D, Cameron H, Chao HM, Gould E, Hastings N, Kuroda Y, Luine V, Magarinos AM, McKittrick CR, et al. 1995. Stress and the brain: a paradoxical role for adrenal steroids. *Vitam Horm* 51: 371-402.

McIntosh GH, Baghurst KI, Potter BJ, Hetzel BS. 1979. Foetal brain development in the sheep. *Neurophat and Appl Neurobiol* 5: 103-114.

Meyer JS. 1985. Biochemical effects of corticosteroids on neuronal tissues. *Physiol Rev* 65: 946-1020.

Mirabile C, Draper M, Veille JC, Mueller-Heubach F. 1999. Single versus multiple course of glucocorticoid administration and effects on fetal growth (Abstract). *Am J Obstet Gynecol* 178: 183.

Moftaquir Handaj A, Jafari S, Boutroy MJ. 1999. Neonatal catecholamine content of adrenal and extra-adrenal chromaffin tissue after prenatal exposure to dexamethasone. *Pediatr Res* 45(1): 60-65.

Moore KE & Phillipson OT. 1975. Effects of dexamethasone on phenylethanolamine N-methyltransferase and adrenaline in the brains and superior cervical ganglia of adult and neonatal rats. *J Neurochem* 25(3): 289-294.

Moss TJM, Sloboda DM, Gurrin LC, Harding R, Challis JRG, Newnham JP. 2001. Programming effects in sheep of prenatal growth restriction and glucocorticoid exposure. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 281: R960-R970.

Moss TJM, Nitson I, Harding R, Newnham JP. 2003. Differential Effects of Maternal and fetal Betamethasone Injection in Late-Gestation Fetal Sheep. *J Soc Gynecol Investig* 10: 474-479.

Moss TJM, Doherty DA, Nitson I, Sloboda DM, Harding R, Newnham JP. 2005. Effects into adulthood of single or repeated antenatal corticosteroids in sheep. *Am J Obstet Gynecol* 192: 146-152.

Mulder EJ, Derks JB, Zonneveld MF, Bruinse HW, Visser GH. 1994. Transient reduction in fetal activity and heart variation after maternal betamethasone administration. *Early Hum Dev* 36(1): 49-60.

Mulder EJ, derks JB, Visser GH. Effects on antenatal betamethasone administration on fetal heart rate and behaviour in twin pregnancy. *Pediatr Res* 56: 35-39.

Müller, T, Schubert, H., Schwab M. 2003. Early prediction of fetal numbers in sheep based on peripheral plasma progesterone concentrations and season of the year. *Veterinary Record* 152: 137-138.

Müller T, Löhle M, Schubert H, Bauer R, Wicher C, Antonow-Schlorke I, Sliwka U, Nathanielsz PW, Schwab M. 2002. Developmental changes in cerebral autoregulatory capacity in the fetal sheep parietal cortex. *J Physiol* 539(3): 957-967.

Muneoka K, Mikuni M, Ogawa T, Kitera K, Kamei K, Takigawa M, Takahashi K. 1997. Prenatal dexamethasone exposure alters brain monoamine metabolism and adrenocortical response in rat offspring. *Am J Physiol* 273: R1669-R1675.

Munk A, Naray-Fejes-Toth A. 1994. Glucocorticoids and stress: permissive and suppressive actions. *Ann N Y Acad Sci* 746: 115-120.

Nagamatsu S, Kornhauser JM, Burant CF, Seino S, Mayo KE, Bell GI. 1992. Glucose transporter expression in the brain. *J Biol Chem* 267: 467-472.

Nagamatsu S, Sawa H, Nakamichi Y, Katahira H, Inoue N. 1994. Developmental expression of GLUT3 glucose transporter in the rat brain. *FEBS Lett* 46(2-3): 161-164.

Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A. 1993. Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog Neurobiol* 40: 163-221.

Nehlig A. 1997. Zerebral energy metabolism, Glukose transport and blood flow: changes with maturation and adaptation to hypoglycaemia. *Diabetes Metab* 23(1): 18-29.

Nehlig A, deVasconcelos AP, Boyet S. 1988. Quantitative audioradiographic measurement of local zerebral Glukose utilization in freely moving rats during postnatal development. *J Neurosci* 8: 2321-2333.

Newnham JP, Evans SF, Godfrey M, Huang W, Ikegami M, Jobe A. 1999. Maternal, but not fetal, administration of corticosteroids restrict fetal growth. *J Matern Fetal Med* 8: 81-87.

Newnham JP. Is prenatal glucocorticoid administration another origin of adult disease. 2001. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 28: 957-961.

NIH. 2000. Antenatal corticosteroids revisited: repeat courses. *NIH Consens Statement* 17(2): 1-18.

Nulart F, Godoy A, Reinicke K. 1999. Expression of the hexose transporters GLUT1 and GLUT2 during the early development of the human brain. *Brain Res* 824: 97-104.

Ohlsson A, Bottu J, Govan J, Ryan ML, Myhr T, Fong K. 1994. The effect of dexamethasone on time averaged mean velocity in the middle zerebral artery in very low birth weight infants. *Eur J Pediatr* 153(5): 363-366.

Padbury JF, Polk DH, Ervin MG, Berry LM, Ikegami M, Jobe AH. 1995. Postnatal cardiovascular and metabolic responses to a single intramuscular dose of betamethasone in fetal sheep born prematurely by cesarean section. *Pediatr Res* 38(5): 709-715.

Panel NCD Consensus Development Panel. 1995. Effect of corticostereoids for fetal maturation on perinatal outcomes. *Am J Obstet Gynecol* ,173: 246-252.

Pardridge WM, Boado RJ, Farrell CR. 1990. Brain-type glucose transporter GLUT1 is selectively localized to the blood-brain barrier. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 18035-18040.

Patel FA, Sun K, Challis JRG. 1999. Local modulation by β -hydroxysteroid dehydrogenase of glucocorticoid effects on the activity of 15-hydroxy-prostaglandin dehydrogenase in human chorion and placental trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metabol* 84: 395-400.

Pavlidis C, Watanabe Y, Magarinos AM, McEwen BS. 1995. Opposing roles of type I and type II adrenal steroid receptors in hippocampal long-term potentiation. *Neuroscience* 68: 378-394.

Petersen MC, Nation RL, Ashley JJ, McBride WG. 1980. The placental transfer of betamethason. Eur J Clin Pharmacol 18: 245-247.

Phillips DI. 1998. Birth weight and the future development of diabetes. A review of the evidence. Diabetes Care 21: B150-B155.

Pildner von Steinburg S, Voigt M, Fusch C, Hesse V, Schneider KTM. 2005. Einfluss des maternalen Alters auf die Frühgeburtenrate in Deutschland. Geburtshilfe Neonatol 209: DOI: 10.1055/s-2005-923074

Pratt L, Magness RR, Phernetton T, Hendricks SK, Abbott DH, Bird IM. 1999. Repeated use of betamethason in rabbits: Effects of treatment variation on adrenal suppression, pulmonary maturation and pregnancy outcome. Am J Obstet Gynecol 180: 1-11.

Quelle 1 Internet: sigmaaldrich.com (01/2005)

Quinlivan JA, Archer MA, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. 2000. Fetal sciatic nerve growth is delayed following repeated maternal injections of corticosteroids in sheep. J Perinat Med 28: 26-33.

Quinlivan JA, Beazley LD, Braekevelt CR, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. 2001. Repeated ultrasound guided fetal injections of corticosteroids alter nervous system maturation in the ovine fetus. J Perinat Med 29: 112-127.

Reinprecht I, Gschanes A, Windisch M, Fachbach G. 1999. Two peptide rgic drugs inrease the synaptophysin immunoreactivity in brains of 24-month-old-rats. Histochem J. 32(2): 79-84.

Reynolds E O R, Jacobson H N, Motoyama E K, Kikkawa Y, Craig J M, Orzalesi MM, Cook C D. 1965. The effect og immaturity and prenatal asphyxia on the lungs and pulmonary function of newborn lambs: The experimental production of respiratory distress. Pediatrics 35: 382.

Roche-Lexikon Medizin 1998, Urban & Fischer Verlag, 4. Auflage

Roedel M. 2002. Akute Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die Hirndurchblutung und die elektrokortikale Hirnfunktion beim fetalen Schaf in utero. Dissertationsschrift. Friedrich-Schiller-Universität, Jena.

Roessmann U, Gampetti P. 1986. Astrocytes in the developing human brain. An immunohistochemical study. Acta Neuropathol Berl. 70: 308-313.

Rong W, Wang W, Yuan W, Chen Y. 1999. Rapid effects of corticosterone on cardiovascular neurons in the rostral ventrolateral medulla of rats. Brain Res 815: 51-59.

Rotmensch S, Liberati M, Celentano C, Efrat Z, Bar-Hava I, Kovo M, Golan A, Moravski G, Ben-Rafael Z. 1999. The effect of betamethasone on fetal biophysical activities and Doppler velocimetry of umbilical and middle cerebral arteries. *Acta Obstet Gynecol Scand* 78(9): 768-773.

Ruckebusch Y. 1972. Development of sleep and wakefulness in the fetal lamb. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32: 119-128.

Rumsey SC, Kwon O, Xu GW, Burant CF, Simpson I, Levine M. Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport Dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* 30: 18982-18989, 1997

Sakyo T, Kitagawa T. Differential localization of Glukosetransporter isoforms in non-polarized mammalian cells: distribution of GLUT1 but not GLUT3 to detergent-resistant membrane domains. *Biochim Biophys Acta* 1567(1-2): 165-175, 2002

Sapolsky RM, Meaney MJ. 1986. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanism and the stress hyporesponsive period. *Brain Res Rev* 396: 64-76.

Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE. 1990. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci* 10: 2897-2902.

Sapolsky RM. 1994. The physiological relevance of glucocorticoid endangerment of the hippocampus. *Ann N Y Acad Sci* 746: 294-304.

Scheinberg P. 1965. Observations on cerebral carbohydrate metabolism in man. *Ann Intern Med* 62: 367-371.

Scheunert A., Trautmann A.: 1987. *Lehrbuch der Veterinär-Physiologie*, 7. Auflage, Paul Parey Verlag Berlin und Hamburg, 194-195.

Schleussner E, Arnscheidt C, Müller T, Schneider U, Haueisen J, Schwab K, Schwab M. 2004. Effects of antenatal glucocorticoids on human fetal cortical function detected by fetal magnetencephalography. *J Soc Gynecol Invest* 11 (Suppl) 69.

Schumacher M. 1990. Rapid membrane effects of steroid hormones: an emerging concept in neuroendocrinology. *Trends Neurosci* 13: 359-362.

Schwab M, Roedel M, Anwar MA, Müller T, Schubert H, Buchwalder LF, Walter B, 2000. Nathanielsz PW. Effects of betamethasone administration to the fetal sheep in late gestation on fetal cerebral blood flow. *J Physiol (London)* 528(3): 619-632.

Schwab M, Antonow-Schlorke I, Kühn B, Müller T, Schubert H, Walter B, Sliwka U, Nathanielsz PW. 2001. Effect of antenatal betamethasone treatment on microtubule associated proteins MAP1B and MAP2 in fetal sheep. *J Physiol (London)* 530(3): 497-506.

Schwab M, Schmidt K, Roedel M, Müller T, Schubert H, Anwar MA, Nathanielsz PW. 2001b. Nonlinear changes of electrocortical activity after antenatal betamethasone treatment in fetal sheep. *J Physiol* 531(2): 535-543.

Schwab M. 2002. Die Beeinflussung der fetalen Hirnfunktion durch Glukokortikoide sowie vibroakustische und thermische Stimulation. S. 115 [Habilitationssarbeit]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

Schwab M, Coksaygan T, Samtani M, Jusko WJ, Nathanielsz PW. 2004. Betamethasone plasma concentrations after maternal and fetal exposure in sheep. *J Soc Gynecol Invest* 11 (Suppl.): 130.

Schwab M, Coksaygan T, Samtani M, Jusko WJ, Nathanielsz PW. 2006a. Kinetics of betamethasone and fetal cardiovascular adverse effects in pregnant sheep after different doses. *Obstet Gynecol* 108:617-625.

Schwab M, Wichmann G, Maurer I, Loehle M, Nathanielsz PW, Witte OW. 2006b. Antenatal glucocorticoids suppress mitochondrial activity but do not decrease ATP content in the fetal ovine brain. *J Soc Gynecol Invest* 13 (Suppl.): 732.

Scully JL, Otten U. 1995. Glucocorticoids, neutrophils and neurodegeneration. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52: 391-401.

Seckl JR. 1998. Physiologic programming of the fetus. *Clin Perinatol* 25: 939-962.

Seckl JR. 2001. Glucocorticoid programming of the fetus, adult phenotypes and molecular mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* 185(1-2): 61-71.

Segar JL, Lumbers ER, Nuyt AM, OJ SM, Robillard JE. 1998. Effect of antenatal glucocorticoids on sympathetic nerve activity at birth in preterm sheep. *Am J Physiol* 43 (1): R160-R167.

Senat MV, Minoui S, Multon O, Fernandez H, Frydman R, Ville Y. 1998. Effects of dexamethasone and betamethasone on fetal heart rate variability in preterm labour: a randomised study. *Br J Obstet Gynaecol* 105: 749-755.

Sessa WC & Naeije A. 1990. Dexamethasone selectively attenuates prostanoinduced vasoconstrictor responses in vitro. *Circ Res* 66(2): 383-388.

Siegel S. 1985. Nichtparametrische statistische Methoden, 2. Ausgabe. Fachbuchhandlung für Psychologie, Eschborn bei Frankfurt am Main.

Simpson IA, Appel NM, Hokari M, Oki J, Holman GD, Maher F, Koehler-Stec EM, Vannucci S, Smith QR. 1999. Blood-Brain Barrier Glucose Transporter: Effects of Hypo- and Hyperglycemia Revisited. *J. Neurochem.* 72: 238-247.

Sinervo K, Lange I. 1999. Maternal and neonatal outcomes following single versus multiple courses of corticosteroids. 182: 52.

Sivitz W, DeSautel S, Walker PS, Pessin JE. 1989. Regulation of the glucose transporter in developing rat brain. *Endocrinology* 124:1875-1880.

Sloboda D, Newnham J, Challis J. 2000. Effect of repeated maternal betamethason administration on growth and HPA function of the ovine fetus at term. *J. Endocrinol* 165: 79-91.

Smolders-de Haas H, Neuvel J, Schmand B, Treffers PE, Koppe JG, Hoeck J. 1990. Physical development and medical history of children who were treated antenatally with corticosteroids to prevent RDS: a 10-12 year follow up. *Pediatrics* 86: 65-70.

Sokoloff L, Reviich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M. 1977. The [¹⁴C]deoxyGlucose method for the measurement of local cerebral Glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 28: 897-916.

Stein HM, Oyama K, Martinez A, Chappell BA, Buhl E, Blount L, Padbury JF. 1993. Effects of corticosteroids in preterm sheep on adaptation and sympathoadrenal mechanisms at birth. *Am J Physiol* 264: E763-769.

Stewart PA, Hayakawa K, Farrell CL. 1994. Quantitation of blood-brain barrier ultrastructure. *Microsc Res Tech* 27: 516-527.

Strahlmann M, LeQuire V S, Young W C, Merrill R E, Birmingham R T, Payne G A, Gray J. 1964. Pathophysiology of respiratory distress in newborn lambs. *Am J. Dis. Child* 108: 375.

Sun B, Jobe AH, Ridger E, Ikegami M. 1993. Single dose versus two doses of betamethasone for lung maturation in preterm rabbits. *Pediatr Res* 33: 265-260.

Szeto HH, Hinman. 1985. Prenatal development of sleep-wake patterns in sheep. *Sleep* 8: 347-355.

Takata K. 1996. Glucose transporters in the transepithelial transport of Glucose. *J Electron Microsc* 45(4): 275-284.

Takao Y, Akazawa S, Matsumoto K, Takino H, Akazawa M, Trocino RA, Maeda Y, Okuno S, Kawasaki E, Uotani S, Yokota A, Nagataki S. 1993. Glucose transporter gene expression in rat conceptus during high glucose culture. *Diabetologia* 36: 696-706.

Tangelakis K, Lumbers ER, Moritz KM, Towstoles MK, Wintour EM. 1992. Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine Fetus. *Exp Physiol* 77(5): 709-717.

Thoidis G, Kupriyanova T, Cunningham JM, Chen P, Cadel S, Foulon T, Cohen P, Fine RE, Kandrór KV. 1999. Glucose transporter GLUT3 is targeted to secretory vesicles in neurons and PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 14064-14066.

Tough SC, Newburn-Cook C, Johnston DW, Svenson LW, Rose S, Belik J. 2002. Delayed childbearing and its impact on population Ratte changes in lower birth weight, multiple birth, and preterm delivery. *Pediatrics* 109(3): 399-403.

Trautman PD, Meyer-Bahlburg HFL, Postelnek J. 1995. Effects of early prenatal dexamethasone on the cognitive and behavioral development of young children: results of a pilot study. *Psychoneuroendocrinology* 20: 439-449.

Trocino RA, Akazawa S, Takino H, Takao Y, Matsumoto K, Maeda Y, Okuno S, Nagataki S. 1994. Cellular-tissue localization and regulation of the GLUT1 protein in both the embryo and the visceral Yolk Sac from normal and experimental diabetic rats during the early postimplantation period. *Endocrinol* 134: 869-878.

Tucker RP. 1990. The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Reviews* 15: 101-120.

Tuor UI, Yager JY, Bascaramurty S, DelBigio MR. 1997. Dexamethasone prevents hypoxia/ischemia-induced reductions in zerebral Glukose utilization and high-energy phosphate metabolites in immature brain. *J Neurochem* 69: 1954-1963.

Uno H, Eisele S, Sakai A, Shelton S, Baker E, DeJesus O, Holden J. 1994. Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm Behav* 28(4): 336-348.

Uno H, Lohmiller L, Thieme C, Kemnitz JW, Engle MJ, Roecker EB, Farrell PM. 1990. Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethason in ftal rhesus macaques. I. Hippocampus. *Dev Brain Res* 53: 157-167.

Van den Berg DT, de Kloet ER, van Dijken HH, de Jong W. 1990. Differential central effects of mineralcorticoid and glucocorticoid agonists on blood pressure. *Endocrinology* 126: 118-124.

- Vannucci RC, Christensen MA, Stein DT. 1989. Regional cerebral glucose utilization in the immature: effect of hypoxia-ischemia. *Pediatr Res*. 26: 208-214.
- Vannucci S. 1994. Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 Glucose Transporters in Rat Brain. *J. Neurochem* 62: 240-246.
- Vannucci SJ, Clark RR, Koehler-Stec E, Li K, Smith CB, Davies P, Maher F, Simpson IA. 1998. Glucose transporter expression in brain: relationship to cerebral Glucose utilization. *Dev Neurosci* 20(4-5): 369-379.
- Vannucci SJ, Reinhart R, Maher, Bondy CA, Lee WH, Vannucci RC, Simpson IA. 1998. Alterations in GLUT1 and GLUT3 glucose transporter gene expression following unilateral hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *Developmental Brain Research* 107: 255-264.
- Vannucci SJ, Gibbs EM, Simpson IA. 1997. Glucose utilization and Glucose transporter proteins GLUT1 and GLUT3 in brains of diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 272: E267-E274.
- Vannucci SJ, Simpson IA. 2003. Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E1127-E1134.
- Vannucci SJ. 1994. Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 Glucose transporters in rat brain. *J Neurochem* 62: 240-246.
- Vannucci RC, Vannucci SJ. 2000. Glucose Metabolism in the Developing brain. *Seminars in Perinatology*, Vol 24, 2: 107-115.
- Vannucci SJ. 1994. Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 Glucose transporters in rat brain. *J Neurochem* 62: 240-246.
- Veterinary Record. 2003. 152: 137-138.
- Vicedomini JP, Nonneman AJ, DeKosky ST, Scheff SW. 1985. Perinatal glucocorticoids alter dentate gyrus electrophysiology. *Brain Res Bull* 15: 111-116.
- Vicedomini JP, Nonneman AJ, DeKosky ST, Scheff SW. 1986. Perinatal glucocorticoids disrupt learning: a sexually dimorphic response. *Physiol Behav* 36: 145-149.
- Viereck C, Tucker RP, Binder LI, Matus A. 1988. Phylogenetic conservation of brain microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *Neuroscience* 26(3): 893-904.
- Vorbrodt AW, Dobrogowska DH, Tarnawski M, Meeker HC, Carp RI. 2001. Quantitative immunogold study of GLUT1 in five brain regions of streptozotocin-infected mice showing obesity and reduced glucose tolerance. *Acta Neuropathol* 102: 278-284.

Wagerle LC, DeGiulio PA, Mishra OP, Delivoria Papadopoulos M. 1991. Effect of dexamethasone on cerebral prostanoid formation and pial arteriolar reactivity to CO₂ in newborn pigs. *Am J Physiol* 260(4 Pt 2): H1313-1318.

Walfish A, Hallak M, Mazor M. 2001. Multiple courses of antenatal steroids: Risk and benefits. *Obstet Gynecol* 98: 491-497.

Wan DC & Livett BG. 1989. Induction of phenylethanolamine N-methyltransferase mRNA expression by glucocorticoids in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Eur J Pharmacol* 172(2): 107-115.

Weidenfeld J, Lysy J, Shohami E. 1987. Effect of dexamethasone on prostaglandin synthesis in various areas of the rat brain. *J Neurochem* 48(5): 1351-1354.

Weinstock M. 1997. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Neurosci Biobehav Rev* 21: 1-10.

Wilcoxon F. 1945. Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin* 1: 80-83.

Windholz E, Gschanes A, Windisch M, Fachbach G. 2000. Two peptidergic drugs increase the synaptophysin immunoreactivity in brains of 6-week-old rats. *Histochem J* 32(2):79-84.

Wong DL, Hayashi RJ, Ciaranello RD. 1985. Regulation of biogenic amine methyltransferases by glucocorticoids via S-adenosylmethionine and its metabolizing enzymes, methionine adenosyltransferase and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Brain Res* 330(2): 209-216.

Wood CE, Schwab M, Coksaygen T, Nathanielsz PW. 2003. Downregulation of prostaglandin endoperoxide synthase-2 gene expression by betamethasone in ovine fetal brain stem and cortex. *J Soc Gynecol Invest* 10 (Suppl.): 764.

Wurtman RJ & Axelrod J. 1966. Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids. *J Biol Chem* 241(10): 2301-2305.

Yang K, Jones SA, Challis JR. 1990. Changes in glucocorticoid receptor number in the hypothalamus and pituitary of the sheep fetus with gestational age and after adrenocorticotropin treatment. *Endocrinology* 126: 11-17.

Young AM, Allen CE, Audus KL. 2003. Efflux transporters of the human placenta. *Adv Drug Deliv Rev* 55:125-132.

LITERATURVERZEICHNIS

Zhu DN, Xue LM, Li P. 1995. Cardiovascular effects of microinjection of corticoids and antagonists into the rostral ventrolateral medulla in rats. Blood Press 4: 55-62.

Zovein A, Flowers-Ziegler J, Thamocharan S, Shin D, Sankar R, Nguyen K, Gambhir S, Devaskar SU. 2003. Postnatal hypoxic-ischemic brain injury alters mechanism mediating neuronal Glukose transport. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 286: 273-282.

9 Anhang

9.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mir bei der Durchführung und Fertigstellung der vorliegenden Arbeit Unterstützung gaben.

Mein besonderer Dank gilt:

Frau **Dipl. Biol. Iwa Antonow-Schlorke** für die sehr liebevolle und aufopfernde Betreuung

Herrn **PD Dr. med. Mathias Schwab** für die Überlassung des vielseitigen und interessanten Themas sowie für die große Geduld und vielen Hinweise bei Diskussionspunkten

Herrn **Prof. Dr. med. Otto Witte** für Anregungen und Diskussionen

Herrn **Dr. vet. Frank Müller** und Herrn **Dr. vet. Harald Schubert** für die Hilfe bei der Betreuung und Behandlung unserer Versuchstiere

Frau **Claudia Sommer** (MTA) und Frau **Ina Ingris** (MTA) für die freundliche Zusammenarbeit und Hilfe bei der Immuntechnik

Herrn **Dr. med. Andreas Kießling** für anregende und aufschlussreiche Diskussionen sowie Hilfestellung im Rahmen der computertechnischen Umsetzung des schriftlichen Teils der Arbeit

Meiner Frau, meiner Mutter und meinen Schwiegereltern für viele aufmunternde und motivierende Worte, die mir halfen, mein Ziel nicht aus den Augen zu verlieren und **meinem Sohn Bjarne**, der viel Sonne in mein Herz zaubert

9.2 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	<u>Martin</u> Günter Ebert
Adresse	Theaterstr. 23 08523 Plauen Tel.: 03741–2562032 0176–43122476 E-mail: MEbert2204@googlemail.com
Geburtsdatum	22. April 1976
Geburtsort	Plauen
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet
Kinder	ein Sohn
Eltern	Günter Kleesattl, Dipl. Ing. (Forstwirtschaft), 1992 verstorben Sibylle Ebert, FÄ für Allgemeinmedizin, Plauen

Schulbildung:

Sept. 1983 – Juli 1992	Rückert–Grundschule Plauen
Sept. 1992 – Juli 1995	Lessing–Gymnasium Plauen Abitur–Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

Juli 1995 – Juli 1996	Johanniter–Unfall–Hilfe Plauen
-----------------------	--------------------------------

Berufliche Tätigkeit:

Aug. 1996 – Sept. 1997	Ausbildung und Tätigkeit als Rettungssanitäter bei der Johanniter–Unfall–Hilfe Plauen
------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------

Hochschulbildung:

Okt. 1997 – Okt. 2004	Studium der Humanmedizin an der Friedrich–Schiller–Universität Jena
Sommer '2000	Physikum
Sommer '2002	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Sommer '2003	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Okt. '2003 – Okt. '2004	Praktisches Jahr (Chirurgie, WF: Anästhesie, Innere)

Anhang

Famulaturen:

Febr. 2001 – März 2001	Arztpraxis für Allgemeinmedizin Dipl.– Med. S. Ebert, Plauen
Juli 2001 – August 2001	Kreiskrankenhaus Reichenbach Abteilung für Innere Medizin, CA Dr. med K. H. Seliger
Sept. 2002 – Okt. 2002	Arztpraxis für Neurologie und Psychiatrie Dipl.– Med. U. zur Nieden, Plauen
März 2003 – April 2003	Kreiskrankenhaus Reichenbach Abteilung für Innere Medizin, CA Dr. med K. H. Seliger

Promotion:

Thema:	Friedrich–Schiller–Universität Jena Klinik für Neurologie bei PD Dr. med. M. Schwab „Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die fetale Gehirnreifung am Beispiel von Glukosetransportproteinen im immunhistochemischen Studium am fetalen Schaf und Pavian“
--------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Berufliche

Nebentätigkeiten:

Febr. 1998 – Okt. 2004	Nebentätigkeit im ambulanten Pflegedienst Diakonie–verein Pöhl e.V., Plauen
April 1998 – Juli 1999	Hilfspfleger im ehemaligen DRK Pflegeheim Dr.–Friedrich–Wolf–Straße, Plauen
Seit September 2000	Breitenausbilder für Erste–Hilfe bei der Johanniter–Unfall–Hilfe, Plauen

Berufstätigkeit:

Nov. 2004 – Okt. 2005	Tätigkeit als Assistenzarzt für Anästhesie im Heinrich–Braun–Krankenhaus Zwickau
Seit Dez. 2005	Tätigkeit als Assistenzarzt für Anästhesie im Helios–Vogtland–Klinikum Plauen GmbH

Sonstiges:

Veröffentlichungen:	Antonow-Schlorke I, Ebert M, Müller Th, Schubert H, Gschane A, Witte OW, Nathanielsz PW, Schwab M. 2006. Glucose transporter proteins GLUT1 and GLUT3 like immunoreactivities in the fetal sheep brain are not
---------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

reduced by maternal betamethasone treatment.
Neuroscience Letters 403: 261–265.

Antonow-Schlorke I, Ebert M, Li Cu, Gschanes A, Witte OW, McDonald Th, Nathanielsz PW, Schwab M. 2007. Lack of effect of antenatal glucocorticoid therapy in the fetal baboon on cerebral cortical glucose transporter proteins. J Med Primatol 36 (1):17–20.

Fremdsprachen

Gute Kenntnisse in Englisch in Wort und Schrift

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich–Schiller–Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Dipl. Biol. Iwa Antonow-Schlorke, PD Dr. med. Mathias Schwab,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfungen eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Plauen, 7. Oktober 2008

Ebert, Martin